

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE FARMACIA**

**Departamento de Fisiología**



**TESIS DOCTORAL**

**Estudio de la resistencia vascular a la insulina en las  
arterias coronarias y peneanas durante el *síndrome  
metabólico***

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Cristina Contreras Jiménez**

**Directores**

**Dolores Prieto Ocejo  
Albino García Sacristán**

**Madrid, 2011**

**ISBN: 978-84-695-0741-4**

© Cristina Contreras Jiménez, 2011

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA



**ESTUDIO DE LA RESISTENCIA VASCULAR A LA  
INSULINA EN LAS ARTERIAS CORONARIAS Y  
PENEANAS DURANTE EL *SÍNDROME METABÓLICO***

TESIS DOCTORAL

CRISTINA CONTRERAS JIMÉNEZ

Madrid, 2011





UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

SECCIÓN DEPARTAMENTAL DE FISIOLÓGÍA ANIMAL

Dolores Prieto Ocejo, Profesora Titular de Fisiología, y Albino García Sacristán,  
Catedrático de Fisiología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid,

### CERTIFICAN:

Que D<sup>a</sup> **Cristina Contreras Jiménez**, Licenciada en Farmacia por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo su dirección, el trabajo de investigación titulado **“Estudio de la resistencia vascular a la insulina en las arterias coronarias y peneanas durante el *Síndrome Metabólico*”** para optar al Grado de Doctor en Farmacia por la Universidad Complutense de Madrid.

Madrid, Mayo de 2011

Dra. Dolores Prieto Ocejo

Prof. Dr. Albino García Sacristán



***A mis padres y a Miguel***



"Sólo aquellos que se arriesgan a ir muy lejos,  
pueden llegar a saber lo lejos que pueden ir"

(T.S. Elliot)





## Agradecimientos

*Durante los cuatro años que ha durado esta tesis he aprendido mucho más que ciencia, y puedo estar orgullosa de la gente que me ha rodeado. Por ello, con este apartado me gustaría dar homenaje a todas las personas que de alguna forma han aportado algo a este trabajo.*

En primer lugar quisiera agradecer a la Dra. Dolores Prieto Ocejó, directora de esta tesis, la oportunidad que me dio, por confiar en mí desde el primer momento, por el tiempo inestimable que me ha dedicado y por enseñarme con tanto rigor científico. Soy partidaria de que las cosas bien aprendidas son las que perduran en el tiempo y estoy convencida de que me ha aportado una base muy sólida en fisiología vascular. Es el vivo reflejo de que con trabajo se consiguen las metas personales, y le doy las gracias por contagiarnos con su entusiasmo cuando las cosas en el laboratorio funcionan, es admirable la pasión con la que afronta su trabajo día a día. Simplemente gracias, espero no haber defraudado la confianza que puso en mí.

Al Prof. Albino García-Sacristán, co-director de esta tesis, por acogerme en el seno de este equipo tan magnífico y abrirme las puertas de su laboratorio. También por los buenos consejos y por las oportunidades brindadas. Y sobre todo, porque me apasiona su forma de explicar la Fisiología, como si se tratara de un cuento del que siempre querías saber lo que pasa en la siguiente página.

Gracias a la Dra. Ana Sánchez, todas las palabras que aquí pudiera escribir se quedarían cortas para agradecer a mi compañera de camino y amiga lo que ha hecho por mí. Te admiro, profesional y personalmente. Me has enseñado, aguantado, aconsejado, reído y llorado conmigo. Has sido la mejor compañera de batalla que podía tener. Muchas gracias Ana, conocerte ha sido una de las mejores cosas de mi tesis. Te adoro.

A la Dra. Carmen Martínez y al Dr. Ramaroson Andriantsitohaina, por acogerme con vosotros con los brazos abiertos como una más de vuestra familia, y por poner a mi disposición todo el material necesario para aprender Western Blotting. Junto a vosotros he

vivido una gran experiencia y he descubierto que además de grandes científicos, sois mejores personas a las que siempre estaré agradecida. Espero que lo que he vivido a vuestro lado sólo sea un preludio de lo mucho que nos queda. Merci Beaucoup!

A los profesores del departamento de Fisiología, todos me habéis enseñado algo importante, y no quisiera olvidarme de ninguno de vosotros. Gracias al Dr. Medardo Hernández, al Prof. Luis Rivera, a la Dra. Paz Recio, a la Dra. Sara Benedito, a la Dra. Cristina Martínez, a la Dra. Emilia Muñoz, a la Dra. Elvira López-Oliva, al Dr. Ángel Agis, a la Dra. Rafaela Raposo, y muy especialmente a la Dra. Belén Climent, con la que he compartido muchos momentos, de alegrías y penas, y ha sido una gran confidente y amiga.

Gracias a los otros doctorandos que vienen detrás pisando fuerte, a Aniuska, Ana, Vitor, Jorge y Jose Luis, sois un gran ejemplo de vocación y tenéis un mérito que no deja de admirarme cada día. Vuestra dedicación debería ser un ejemplo para todos. Gracias por todos los momentos maravillosos que me habéis hecho pasar a vuestro lado. Os deseo mucha suerte en vuestras tesis, podéis contar conmigo para lo que necesitéis.

A Francisco Puente, a Manuel Perales y a Macarena Martín, que por una parte habéis puesto toda vuestra ayuda técnica para hacer posible este sueño, y por otra os habéis convertido en grandes amigos y aportais el lado más humano y divertido al laboratorio. Gracias por ser personas tan grandes.

Quería agradecer a la Dra. María Pilar Martínez su gran trabajo con la inmunocitoquímica. Gracias por tu colaboración y por estar siempre tan dispuesta.

A mis mejores amigas, Ana, Estela, Tamara y Tatiana, habéis sido una gran vía de escape, poniendo mucho más de lo que pensáis en esta tesis. Gracias por darme cada día vuestra inyección de cariño y de humor a partes iguales que tanto me ha ayudado, y por comprenderme tan bien en todo momento. Sois las mejores y os quiero con locura, mis Gs.

A Nena, ese bichito de ojos verdes que me espera en la puerta cuando llego a casa. Nunca pensé que un ser tan pequeño pudiera darme tanto.

Quisiera también agradecer muy especialmente a mi hermano Ángel, porque sin saberlo me has hecho reír cuando más lo necesitaba, y aunque no te lo diga mucho, eres muy importante para mí y de alguna forma hay un vínculo especial entre nosotros. Te quiero.

Las gracias más grandes a mis padres. Vosotros me habéis enseñado las cosas más importantes que sé y os lo debo todo. Gracias a vuestro ejemplo sé que ningún esfuerzo es en vano, y que con dedicación y humildad se puede llegar tan lejos como se quiera. Sé la ilusión especial que os hace esta tesis y lo mucho que significa para vosotros, vuestro orgullo por mí me hace inmensamente feliz. Os quiero.

Y por supuesto, a Miguel, mi compañero de vida y mi niño bonito. Gracias por creer en mis sueños y apostar por ellos. Has sido un gran apoyo y con tus consejos siempre has dado en el clavo (cómo odio que tengas razón siempre). Esta tesis es tan tuya como mía, forma parte de nuestras ilusiones. Y por supuesto, no podían faltar las gracias por tu incondicional ayuda técnica particular. Gracias nene, ILY.



Este trabajo de investigación ha sido financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia (2006-09191) y por el Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2009-10448). Cristina Contreras Jiménez ha disfrutado de una beca predoctoral para la Formación de Personal de Investigación (FPI) del Ministerio de Educación y Ciencia (BES-2007-15205).



## ABREVIATURAS

ACh	Acetilcolina
ADP	Adenosín difosfato
AGEs	Compuestos de glucosilación avanzada
AGL	Ácidos grasos libres
AHA	Asociación americana de cardiología
Ang II	Angiotensina II
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
AT1	Receptor de angiotensina tipo 1
ATP	Adenosín trifosfato
AV	Auriculoventricular
BAEC	Células endoteliales de aorta bovina
BH <sub>4</sub>	Tetrahidrobiopterina
Big ET-1	Pro-endotelina
BSA	Albúmina sérica bovina
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	Concentración de calcio intracelular
CaM	Calmodulina
CCR	Curva concentración-respuesta
CoA	Coenzima A
COX	Ciclooxigenasa
CRP	Proteína reactiva C
DAG	Diacylglicerol
DE	Disfunción eréctil
ECE	Enzima convertidora de endotelina
ECP	Células progenitoras del endotelio
EDHF	Factor hiperpolarizante derivado del endotelio
eNOS	Sintasa del óxido nítrico endotelial
ERK	Cinasa regulada por señales extracelulares
ET-1	Endotelina-1
ET <sub>A</sub>	Receptor de ET tipo A
ET <sub>B</sub>	Receptor de ET tipo B
GCs	Guanilato ciclasa soluble



GDP	Guanosín difosfato
GEF	Factores intercambiadores de nucleótidos de guanina
GFAT	Fructosa-6-fosfato amino transferasa
GLUT	Proteínas transportadoras de glucosa
GMP	Guanosín monofosfato
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
Gs	Proteína G excitatoria
GSH	Glutation peroxidasa
GTP	Guanosín trifosfato
5-HT	Serotonina (5-hidroxitriptófano)
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HLA	Complejo de histocompatibilidad mayor leucocitario
HSP90	Proteína Heat Shock 90
HUVEC	Células endoteliales venosas de cordón umbilical humano
ICAM	Moléculas de adhesión intracelular
IGF	Factor de crecimiento insulínico
IL	Interleucina
IMC	Índice de masa corporal
INE	Instituto nacional de estadística
iNOS	Sintasa del óxido nítrico inducible
IPGs	Inositol-fosfoglicanos
IR	Receptor de insulina
IRS	Sustrato del receptor de insulina
I $\kappa$ $\kappa$ $\beta$	Complejo I $\kappa$ $\beta$ cinasa
JNK	Proteína c-jun NH <sub>2</sub> terminal cinasa
K <sub>Ca</sub>	Canales de K <sup>+</sup> activados por Ca <sup>2+</sup>
KPSS	Solución salina fisiológica rica en K <sup>+</sup>
LDL	Lipoproteína de baja densidad
L-NNA	N <sup>G</sup> -nitro-L-arginina
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos
MCP	Proteína quimotáctica de monocitos
MLC	Cadenas ligeras de miosina
MLCK	Cinasa de las cadenas ligeras de miosina
MLCP	Fosfatasa de las cadenas ligeras de miosina
NADPH	Adenina dinucleótido fosfato

NANC	No-adrenérgico no-colinérgico
nNOS	Sintasa del óxido nítrico neural
NO	Óxido nítrico
NOS	Sintasa del óxido nítrico
NPY	Neuropéptido Y
O <sub>2</sub>	Oxígeno molecular
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Anión superóxido
PAI-1	Inhibidor del activador de plasminógeno
PDF	Factor derivado de plaquetas
PKD	Proteína cinasa dependiente de PIP <sub>3</sub>
PGE <sub>1/2</sub>	Prostaglandina E tipo 1/2
PGF <sub>2α</sub>	Prostaglandina F tipo 2α
PGH <sub>2</sub>	Prostaglandina H tipo 2
PGI <sub>2</sub>	Prostaciclina
Phe	Fenilefrina
PI <sub>3</sub>	Fosfatidil inositol trifosfato
PI3K	Fosfatidil inositol-3-cinasa
PIP <sub>2</sub>	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
PIP <sub>3</sub>	Fosfatidil inositol-3,4,5-trifosfato
PKC	Proteína cinasa C
PLC	Fosfolipasa C
PSS	Solución salina fisiológica
RAGEs	Receptores específicos para AGEs
RAS	Sistema local renina angiotensina
RhoK	Cinasa Rho
ROC	Canales de Ca <sup>2+</sup> operados por receptor
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RZL	Rata <i>Zucker lean</i>
RZO	Rata <i>Zucker obesa</i>
SDS	Dodecil sulfato sódico
SOD	Superóxido dismutasa
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
TxA <sub>2</sub>	Tromboxano A <sub>2</sub>
UDP	Uridina 5'-difosfato
VCAM	Moléculas de adhesión a células vasculares

VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VIP	Péptido intestinal vasoactivo
VOC	Canales de $\text{Ca}^{2+}$ operados por voltaje



## ÍNDICE



<b>I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>1</b>
<b>1. ACCIONES CARDIOVASCULARES DE LA INSULINA.....</b>	<b>3</b>
<b>1.1. Insulina .....</b>	<b>3</b>
<b>1.2. Acciones cardiovasculares de la insulina .....</b>	<b>7</b>
1.2.1. Formación de NO: acción vasodilatadora de la insulina .....	8
1.2.2. Formación de ET-1: acción vasoconstrictora de la insulina .....	13
1.2.2.1. <i>Papel de la ET-1 en la fisiología y fisiopatología vascular .....</i>	<i>14</i>
1.2.3. Acciones de la insulina en el músculo liso vascular .....	18
1.2.4. Acciones de la insulina en el corazón.....	19
<b>2. RESISTENCIA VASCULAR A LA INSULINA .....</b>	<b>23</b>
<b>2.1. Diabetes mellitus .....</b>	<b>28</b>
2.1.1. Complicaciones agudas de la diabetes mellitus.....	30
2.1.1.1. <i>Hipoglucemia.....</i>	<i>30</i>
2.1.1.2. <i>Cetoacidosis diabética .....</i>	<i>31</i>
2.1.1.3. <i>Síndrome hiperglucémico hiperosmolar no cetónico .....</i>	<i>31</i>
2.1.2. Complicaciones crónicas de la diabetes mellitus.....	31
2.1.2.1. <i>Hiperglucemia y glucosilación no enzimática.....</i>	<i>32</i>
2.1.2.2. <i>Hiperglucemia y la vía de los polioles.....</i>	<i>33</i>
2.1.2.3. <i>Proteína cinasa C (PKC) .....</i>	<i>33</i>
2.1.2.4. <i>Enfermedad microvascular.....</i>	<i>33</i>
2.1.2.5. <i>Enfermedad macrovascular.....</i>	<i>35</i>
2.1.2.6. <i>Neuropatías diabéticas.....</i>	<i>36</i>
<b>2.2. Resistencia a la insulina y disfunción endotelial.....</b>	<b>36</b>
2.2.1. Hiperinsulinemia .....	37
2.2.2. Glucotoxicidad .....	39
2.2.3. Lipotoxicidad .....	41
2.2.4. Inflamación.....	42

<b>3.</b>	<b>RESISTENCIA A LA INSULINA Y ENFERMEDAD ARTERIAL CORONARIA</b>	<b>45</b>
3.1.	Fisiología de la circulación coronaria	47
3.2.	Aterosclerosis coronaria y cardiopatía isquémica	50
3.2.1.	Aterosclerosis como causa de cardiopatía isquémica	50
3.2.2.	Importancia vital de la circulación colateral en el corazón	51
3.2.3.	Isquemia miocárdica silente	52
3.3.	Circulación coronaria en estados de resistencia a la insulina	53
3.3.1.	Circulación coronaria y obesidad	57
<b>4.</b>	<b>RESISTENCIA VASCULAR A LA INSULINA Y DISFUNCIÓN ERÉCTIL</b>	<b>60</b>
4.1.	Fisiología de la erección	60
4.1.1.	Regulación fisiológica de la erección: dilatadores y constrictores	63
4.1.1.1.	<i>Regulación de la erección: factores vasodilatadores</i>	64
4.1.1.2.	<i>Regulación de la flacidez: factores vasoconstrictores</i>	67
4.2.	Disfunción eréctil y enfermedad cardiovascular	71
4.2.1.	Relación entre disfunción eréctil y disfunción endotelial	74
4.2.1.1.	<i>Alteraciones de la NOS</i>	74
4.2.1.2.	<i>Estrés oxidativo</i>	76
4.2.1.3.	<i>Otros factores derivados del endotelio independientes de NO</i>	76
4.2.1.4.	<i>Vía de RhoA/RhoK: sensibilización al Calcio</i>	77
4.3.	Disfunción eréctil y resistencia a la insulina	78
4.3.1.	Disfunción eréctil y obesidad	80
4.3.2.	Disfunción eréctil y Síndrome Metabólico	81
<b>II.</b>	<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>85</b>
<b>III.</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>91</b>
<b>1.</b>	<b>MATERIAL</b>	<b>93</b>
1.1.	Material biológico	93
1.2.	Material de laboratorio	94
1.2.1.	Instrumentación general	94
1.3.	Reactivos	96

<b>1.4. Soluciones.....</b>	<b>97</b>
1.4.1. Soluciones fisiológicas.....	97
1.4.1.1. <i>Solución salina fisiológica (PSS)</i> .....	97
1.4.1.3. <i>Solución salina fisiológica libre de <math>Ca^{2+}</math></i> .....	98
1.4.2. Soluciones de calibración para los experimentos de FURA-2:.....	99
1.4.2.1. $K^+$ -Hepes <sup>2</sup> <sub>0</sub> .....	99
1.4.2.2. $K^+$ -Hepes <sup>5</sup> .....	99
1.4.3. Tampones utilizados en Western Blotting .....	99
1.4.3.1. <i>Tampón de lisis para la extracción de proteínas</i> .....	99
1.4.3.2. <i>Solución tampón para la electroforesis</i> .....	100
1.4.3.3. <i>Tampón de transferencia 10X</i> .....	100
1.4.3.4. <i>Tampón de transferencia 1X:</i> .....	100
1.4.3.5. <i>TBS-T 10X:</i> .....	100
1.4.3.6. <i>TBS-T 1X:</i> .....	101
1.4.3.7. <i>Solución de strip</i> .....	101
1.4.4. Soluciones para los estudios morfológicos .....	101
1.4.4.1. <i>Tampón fosfato salino (PBS)</i> .....	101
<b>2. MÉTODOS .....</b>	<b>102</b>
<b>2.1. Metodología para los estudios funcionales.....</b>	<b>102</b>
2.1.1. Estudio de la reactividad arterial .....	102
2.1.1.1. <i>Preparación y disección de las arterias</i> .....	102
2.1.1.2. <i>Montaje de las arterias en el miógrafo</i> .....	103
2.1.1.3. <i>Normalización de las arterias</i> .....	104
2.1.2. Determinación del calcio intracelular por ratio-fluorimetría .....	104
2.1.2.1. <i>Introducción a la fluorescencia</i> .....	104
2.1.2.2. <i>Medidas simultáneas de la <math>[Ca^{2+}]_i</math> y la tensión isométrica</i> .....	105
2.1.3. Protocolos experimentales para los estudios funcionales.....	107



2.1.3.1. Protocolos para el estudio de las acciones vasculares de la insulina en arterias peneanas y coronarias .....	107
2.1.3.2. Protocolos para el estudio de las acciones vasculares de la ET-1 en arterias penenanas.....	108
2.1.3.3. Protocolos para el estudio del efecto de la insulina y la ET-1 sobre las variaciones de $[Ca^{2+}]_i$ .....	109
<b>2.2. Estudios para determinación de proteínas por Western Blotting.....</b>	<b>110</b>
2.2.1. Disección y estimulación de las arterias .....	110
2.2.2. Homogenización.....	111
2.2.3. Determinación de la concentración proteica.....	111
2.2.4. Separación de proteínas por electroforesis.....	112
2.2.5. Transferencia de las proteínas a una membrana.....	112
2.2.6. Incubación de anticuerpos.....	113
2.2.7. Revelado.....	113
2.2.8. Reutilización de las membranas ( <i>Strip</i> ).....	114
<b>2.3. Estudios morfológicos .....</b>	<b>115</b>
2.3.1. Inmunocitoquímica .....	115
2.3.2. Tinción estructural .....	116
<b>2.4. Cálculo y análisis estadístico de los resultados.....</b>	<b>117</b>
<b>IV. RESULTADOS .....</b>	<b>119</b>
<b>1. PARÁMETROS GENERALES.....</b>	<b>121</b>
<b>1.1. Parámetros metabólicos.....</b>	<b>121</b>
<b>1.2. Características de la función vasomotora de las arterias penenanas y coronarias de la rata Zucker .....</b>	<b>122</b>
1.2.1. Arterias peneanas .....	122
1.2.2. Arterias coronarias.....	122
<b>1.3. Características estructurales de las arterias peneanas y coronarias .....</b>	<b>123</b>
1.3.1. Características estructurales de las arterias penenas y coronarias .....	123

<b>2. EFECTOS VASOACTIVOS Y VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR DE LA INSULINA EN ARTERIAS CORONARIAS DE RZL Y RZO.....</b>	<b>125</b>
2.1. Efecto de la insulina sobre la contractilidad de las art. coron. de RZL y RZO.....	125
2.2. Papel del endotelio en la respuesta relajante de la insulina en las arterias coronarias de RZL y RZO .....	126
2.3. Papel de la vía de la PI3K/Akt/eNOS en la respuesta vasodilatadora a la insulina de las arterias coronarias de RZL y RZO .....	128
2.3.1. Efecto de la inhibición de PI3K sobre las respuestas relajantes a la insulina y análisis por inmunoblot de la fosforilación de Akt en Ser <sup>473</sup> en arterias coronarias de RZL y RZO.....	128
2.3.2. Efecto de la inhibición de la NOS en las respuestas relajantes a la insulina y análisis por inmunoblot de la fosforilación y expresión de eNOS en arterias coronarias de RZL y RZO .....	132
2.4. Papel de la vía MAPK/ERK en la respuesta vasodilatadora a la insulina de las arterias coronarias de RZL y RZO .....	134
2.4.1. Inhibición de MAPK y Western Blotting de su actividad y expresión .....	134
2.4.2. Efecto de la inhibición de los receptores de ET-1 .....	136
2.5. Efecto del ácido palmítico sobre la respuesta vasodilatadora inducida por insulina y ACh en las arterias coronarias de RZL y RZO .....	138
<b>3. EFECTOS VASOACTIVOS Y VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR DE LA INSULINA EN ARTERIAS PENEANAS DE RZL Y RZO .....</b>	<b>139</b>
3.1. Efecto de la insulina sobre la contractilidad de las arterias peneanas de RZL y RZO.....	139
3.2. Efecto de la insulina sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en las arterias peneanas de RZL y de RZO .....	140
3.3. Papel del endotelio en las respuestas relajantes de la insulina en las arterias peneanas de RZL y de RZO .....	142
3.4. Papel de la vía de PI3K/Akt/eNOS en la respuesta vascular a la insulina de las arterias peneanas de RZL y RZO.....	144
3.4.1.Efecto de la inhibición de la PI3K.....	144
3.4.2.Efecto de la inhibición de la NOS .....	146
3.5. Papel de la vía de MAPK en la respuesta vascular a la insulina de las arterias peneanas de RZL y RZO .....	147
3.5.1.Efecto de la inhibición de la MAPK .....	147
3.5.2.Efecto de la inhibición de los receptores de ET-1 .....	148
3.6. Caracterización de la respuesta vasoconstrictora a la ET-1 en las arterias peneanas de RZL y RZO .....	149

3.6.1. Efecto de la ET-1 sobre la tensión de las arterias penenanas de RZL y RZO .....	149
3.6.2. Efecto de la ET-1 y del U46619 sobre la $[Ca^{2+}]_i$ de arterias penenanas de RZL y RZO .....	150
3.6.2.1. <i>Efecto de la ET-1 sobre la <math>[Ca^{2+}]_i</math> en arterias peneanas de RZL y RZO .....</i>	<i>150</i>
3.6.2.2. <i>Efecto del U46619 sobre la <math>[Ca^{2+}]_i</math> en arterias peneanas .....</i>	<i>150</i>
3.6.3. Papel del endotelio en la contracción inducida por ET-1 en las arterias peneanas de RZL y de RZO .....	155
3.6.4. Efecto de la inhibición de los receptores de ET-1 .....	156
3.6.4.1. <i>Inhibición no selectiva de los receptores de ET-1 .....</i>	<i>156</i>
3.6.4.2. <i>Implicación de los receptores <math>ET_A</math> en la respuesta contráctil inducida por ET-1 en arterias peneanas de RZL y RZO .....</i>	<i>157</i>
3.6.4.3. <i>Implicación de los receptores <math>ET_B</math> en la respuesta contráctil inducida por ET-1 en arterias peneanas de RZL y RZO .....</i>	<i>159</i>
3.6.5. Localización inmunocitoquímica de los receptores de ET-1 en arterias peneanas de RZL y RZO.....	162
3.6.6. Papel de los nervios perivasculares en las respuestas contráctiles a la ET-1 en arterias peneanas de RZL y RZO .....	163

## **V. DISCUSIÓN ..... 165**

### **1. ACCIONES DE LA INSULINA EN LAS ARTERIAS CORONARIAS BAJO CONDICIONES DE RESISTENCIA A LA INSULINA ..... 168**

1.1. Implicación de la vía de la PI3K/Akt/eNOS en las acciones vasculares de la insulina en las arterias coronarias bajo condiciones de Síndrome Metabólico .....	171
1.2. Implicación de la vía de las MAPK en la vasodilatación inducida por la insulina en las arterias coronarias bajo condiciones de Síndrome Metabólico .....	176

### **2. ACCIONES DE LA INSULINA EN LAS ARTERIAS PENEANAS BAJO CONDICIONES DE RESISTENCIA A LA INSULINA ..... 179**

2.1. Implicación de la vía de la PI3K/Akt/eNOS en la relajación inducida por la insulina en arterias peneanas bajo condiciones de Síndrome Metabólico.....	179
--	-----

2.2.	Implicación de la vía de las MAPK en la vasodilatación inducida por la insulina en arterias peneanas bajo condiciones de Síndrome Metabólico.....	183
3.	<b>PAPEL DE LA ENDOTELINA EN LA REACTIVIDAD ALTERADA DE LAS ARTERIAS PENEANAS BAJO CONDICIONES DE RESISTENCIA A LA INSULINA.....</b>	<b>186</b>
3.1.	Efecto de la ET-1 en arterias peneanas bajo condiciones de Síndrome Metabólico.....	187
3.2.	Papel del $Ca^{2+}$ en la vasoconstricción mediada por la ET-1 bajo condiciones de Síndrome Metabólico .....	188
3.3.	Localización, distribución y efectos de los receptores de endotelina bajo condiciones de Síndrome Metabólico.....	191
VI.	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>195</b>
VII.	<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>199</b>
VIII.	<b>SUMARY AND CONCLUSIONS.....</b>	<b>235</b>





## I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA



## 1. ACCIONES CARDIOVASCULARES DE LA INSULINA

### 1.1. Insulina

La insulina es la hormona anabólica por excelencia que regula la homeostasis de la glucosa y permite a las células disponer de la cantidad de glucosa necesaria para su metabolismo, por lo que su liberación se estimula cuando los niveles de glucosa en sangre son elevados (Cheatham y Kahn, 1995; Pocock y Richards, 2005). Es una hormona polipeptídica formada por 51 residuos de aminoácidos y dos cadenas peptídicas, A y B, unidas por puentes disulfuro (Figura I). Se codifica en el brazo corto del cromosoma 11 y es secretada por la células  $\beta$  de los islotes de *Langerhans* del páncreas en forma de preproinsulina, un precursor inactivo que pierde parte de los residuos del extremo amino terminal en el retículo endoplásmico para formar la proinsulina, aún inactiva, que se escinde en el aparato de Golgi en insulina y péptido C antes de empaquetarse, ambos, en los gránulos secretores, liberándose posteriormente de forma conjunta por exocitosis (Guyton y Hall, 2006).

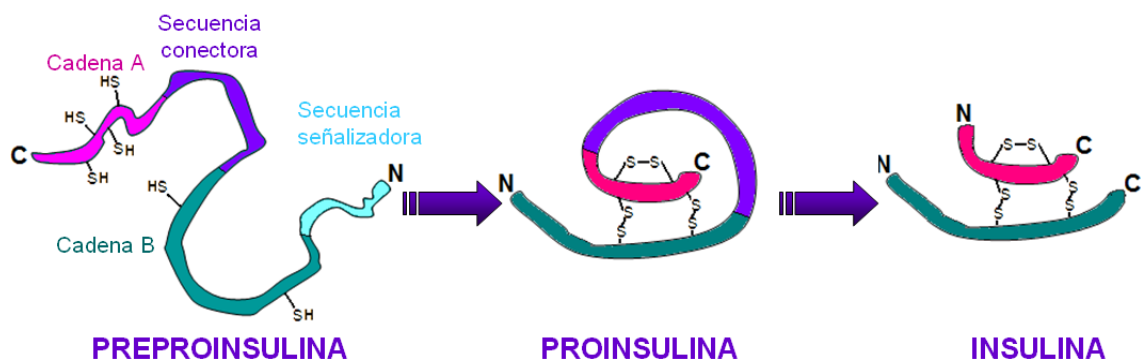
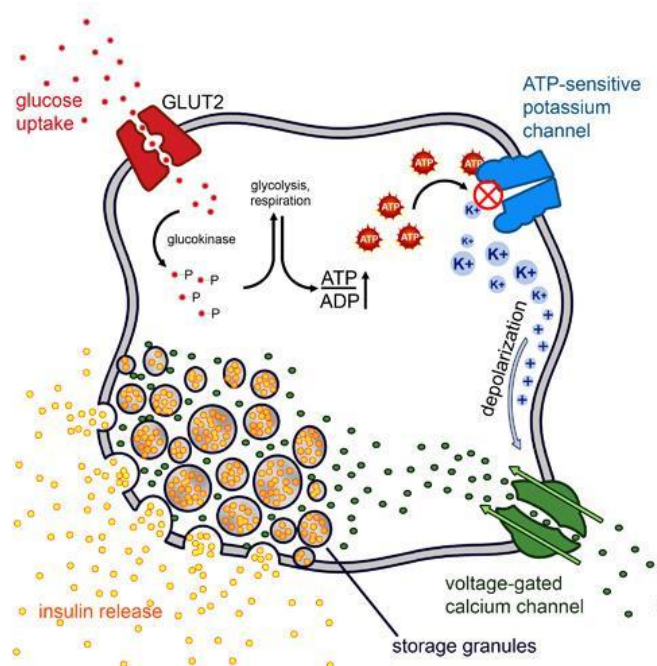


Figura I. Proceso de formación de la insulina a partir de sus precursores.

La liberación de insulina de las células  $\beta$  del páncreas se produce principalmente como respuesta a un aumento de los niveles plasmáticos de glucosa. Cuando los niveles plasmáticos de glucosa son bajos (0-3 mM), las células  $\beta$  tienen un potencial en reposo de -60 mV. A medida que la glucosa plasmática aumenta por encima de 3 mM, comienza su captación por los transportadores de glucosa tipo 2 (GLUT-2) situados en la membrana de las células  $\beta$  (Mueckler, 1994). Una vez en el interior celular, la glucosa sufre una fosforilación por el enzima limitante glucocinasa, convirtiéndose en glucosa-6 fosfato que posteriormente se metaboliza,



oxidándose mediante la glucólisis para la generación de energía en forma de ATP. De este modo, el balance entre ATP/ADP se ve favorecido hacia la formación de ATP, lo que provoca una inactivación de los canales de potasio sensibles al ATP ( $K_{ATP}$ ), que se cierran impidiendo la salida de  $K^+$  de la célula  $\beta$  pancreática. De esta forma el interior celular queda con un exceso de cargas positivas generando potenciales de acción superpuestos que despolarizan la membrana celular, y cuando alcanza el umbral de -55 mV, se produce la apertura de canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje, a través de los cuales comienza la entrada de iones  $Ca^{2+}$  al interior celular. Se produce así un aumento de las concentraciones de  $Ca^{2+}$  citosólico, provocando la liberación de insulina de sus gránulos de almacenamiento por exocitosis, y su difusión hacia vasos sanguíneos cercanos (Figura II) (Pocock y Richards, 2005).



**Figura II. Proceso de liberación de insulina de las células  $\beta$  pancreáticas como respuesta al aumento de los niveles de glucosa sanguíneos** (Adaptación de: MacDonald y Wheeler, 2003).

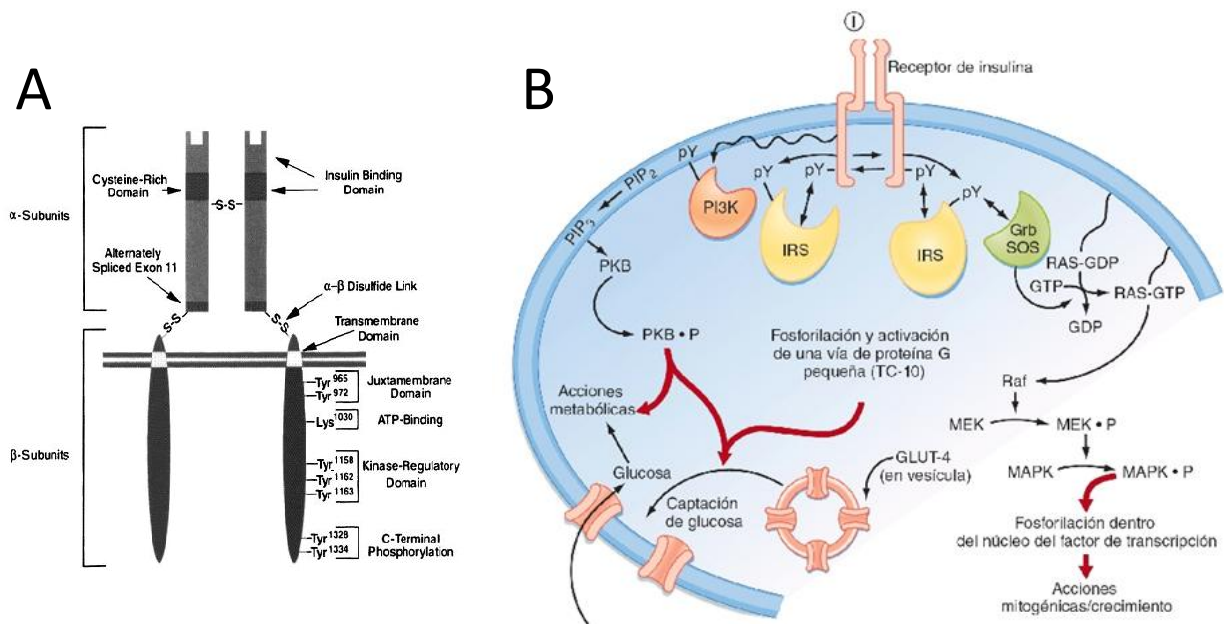
Durante el ayuno, cuando la glucosa plasmática es relativamente baja, en torno a 3-4 mM, la insulina se secreta a una tasa muy baja y apenas es detectable en sangre. Después de una ingesta, la secreción de insulina aumenta a medida que se incrementa la glucosa plasmática, hasta 3-10 veces más, alcanzándose los niveles máximos entre 30 y 60 minutos después del inicio de la comida. Normalmente, la secreción de insulina como respuesta a una carga de glucosa es de naturaleza bifásica. El primer aumento de la tasa de secreción (fase 1) refleja la liberación de insulina disponible, mientras que el incremento tardío (fase 2) se considera dependiente de la síntesis de insulina nueva como respuesta a la carga de glucosa.

La glucosa plasmática alcanza un valor máximo aproximadamente 1 hora después de la ingesta, seguidamente disminuye hasta los valores inferiores a los normales en ayunas, y finalmente se normaliza. La estrecha relación entre la secreción de insulina y las concentraciones plasmáticas de glucosa impide que ésta alcance valores excesivamente elevados (Pocock y Richards, 2005).

La insulina actúa principalmente sobre el metabolismo de hidratos de carbono, lípidos y grasas, produciendo en todos los casos una acción anabólica. Favorece la captación de glucosa por los tejidos facilitando la translocación del transportador de glucosa 4 (GLUT-4), que se encuentra internalizado en el citoplasma, hacia la membrana celular de las células del músculo esquelético, cardíacas y hepáticas principalmente (Mueckler, 1994). En ellas activa la enzima glucógeno sintetasa que estimula la síntesis de glucógeno como reserva energética de la célula, y a su vez se inhibe la enzima glucógeno fosforilasa, evitando así la glucogenolisis (Cheatham y Kahn, 1995). A nivel de los adipocitos, la insulina estimula la captación de ácidos grasos libres para la síntesis de triglicéridos, aumentando los depósitos de almacenamiento de grasa procedente de la alimentación. Se inhibe la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos para obtener energía, y también la formación de cuerpos cetónicos. Sobre el metabolismo proteico la insulina estimula la síntesis y depósito de proteínas, inhibiendo a la vez, su catabolismo (Cheatham y Kahn, 1995).

La insulina inicia sus efectos sobre el metabolismo y el crecimiento celular por unión a su receptor específico, un receptor tirosina cinasa situado en la superficie celular de la mayoría de los tejidos, aunque con especial importancia en el tejido adiposo y en el hígado. En el músculo esquelético se ha comprobado que existe una menor concentración de receptores de insulina y una mayor concentración de receptores del factor de crecimiento insulínico- I (IGF-I), lo que constituye una excepción interesante (Caro et al., 1987).

El receptor de insulina (IR) en su conformación nativa se compone de dos subunidades  $\alpha$  y dos subunidades  $\beta$ , unidas covalentemente por puentes disulfuro (Figura III). La subunidad  $\alpha$  contiene el dominio de unión a la insulina, mientras que la subunidad  $\beta$  posee una función tirosina cinasa activada por la unión de la insulina a la subunidad anterior como describieron Ullrich y Schelessinger en 1990.



**Figura III. (A) Representación del receptor de insulina que muestra los diferentes dominios estructurales y funcionales (Cheatham y Kahn, 1995). (B) La insulina se une a la subunidad  $\alpha$  de su receptor, induciendo una actividad tirosina cinasa en las dos subunidades  $\beta$  intracelulares, lo que desencadena una cascada de fosforilaciones consecutivas para ejercer, en última instancia, sus efectos sobre el metabolismo y crecimiento celular (Berne y Levy, 2009).**

La subunidad  $\alpha$  del IR se localiza enteramente en el dominio extracelular y es la responsable de la unión al ligando. La identificación de los residuos exactos involucrados en el reconocimiento de la insulina y la elevada afinidad de esta unión ha sido algo controvertida ya que la mayoría de los datos disponibles provienen de estudios de mutagénesis, que en muchos casos son difíciles de interpretar, aunque el dominio N-terminal es requerido para la alta afinidad de la unión como determinante primario del reconocimiento del ligando (Cheatham y Kahn, 1995). La subunidad  $\beta$  del receptor de insulina está compuesta por un dominio extracelular muy corto que contiene sitios para N- y O-glucosilación, un dominio transmembrana compuesto por 23 amino ácidos con estructura de  $\alpha$ -hélice, y un dominio intracelular que contiene una tirosina proteína cinasa específica, cuya actividad es requerida para la acción de la insulina. La unión de la insulina a la subunidad  $\alpha$  del IR induce una compleja cascada de auto-fosforilaciones de al menos 7 residuos de tirosina en la subunidad  $\beta$  entre los que está el dominio cinasa regulador (Cheatham y Kahn, 1995). Así, el receptor de insulina es una tirosina cinasa estrechamente controlada por la estimulación de la insulina, y regulada por una compleja cascada de autofosforilaciones en residuos de tirosina (regulación positiva) y en residuos de treonina y serina (posible regulación negativa). Esta función cinasa es crucial para mediar todas las acciones de la insulina, y la carencia de la actividad tirosina cinasa hace a este receptor biológicamente inactivo (Chou et al., 1987; McClain et al., 1987).

Cuando la insulina se une al receptor de insulina, se van a activar dos cascadas de señalización intracelular, que aunque se van a detallar más adelante, brevemente son, en primer lugar, la vía dependiente de la fosfatidil inositol-3—cinasa (PI3K)/Akt, encargada de todas las acciones anabólicas de la insulina así como de la producción de óxido nítrico (NO) a nivel vascular, un potente vasodilatador. En segundo lugar, la insulina activa también la vía de las proteína cinanas activadas por mitógeno (MAPK)/ERK, encargada de las acciones de transcripción genética, síntesis proteica y de crecimiento y diferenciación celular, que a nivel de la vasculatura favorece la producción de endotelina-1 (ET-1), un potente vasoconstrictor.

La insulina a nivel endotelial, induce, por lo tanto, la producción de dos compuestos con acciones antagónicas, NO y ET-1, por lo que su acción neta depende del balance entre ambos.

## **1.2. Acciones cardiovasculares de la insulina**

Para ejercer sus acciones metabólicas y sobre el crecimiento celular, la insulina se une a su receptor activando una cascada de fosforilaciones que desencadenan sus efectos biológicos. La insulina posee receptores también a nivel de los vasos sanguíneos, tanto en el músculo liso como en el endotelio vascular, lo que va a provocar modificaciones en el calibre de algunos lechos vasculares, y con esto, facilitar la captación de sustratos por los tejidos. En los últimos 20 años se ha avanzado enormemente en la investigación y conocimiento de las vías de señalización involucradas en las acciones metabólicas de la insulina encaminadas a estimular la captación de glucosa en el músculo esquelético y en el tejido adiposo produciendo una translocación del GLUT-4 hacia la membrana (Muniyappa et al., 2007).

Las cascadas de señalización activadas por la insulina a nivel de los vasos sanguíneos se pueden dividir en dos: 1) vía de formación óxido nítrico (NO): acción vasodilatadora y 2) vía de formación de endotelina-1 (ET-1): acción vasoconstrictora. Ambas vías de señalización intracelular se detallan a continuación.

### 1.2.1. Formación de NO: acción vasodilatadora de la insulina

Una de las acciones principales de la insulina a nivel vascular es estimular la formación de NO, un potente vasodilatador derivado del endotelio vascular (Zeng y Quon, 1996).

En las células endoteliales, la sintasa del óxido nítrico endotelial (eNOS) cataliza la conversión de L-arginina en NO. La vía clásica de formación de NO endotelial se activa por vasodilatadores como acetilcolina (ACh), bradicinina o histamina, que actúan sobre receptores específicos acoplados a proteínas G excitatorias ( $G_s$ ) por su dominio intracelular (en el caso de la ACh son los receptores muscarínicos  $M_1$  o  $M_3$ ). La unión del ligando a su receptor provoca un cambio conformacional en el dominio citosólico del receptor e interacciona con la proteína G estimulando la liberación de GDP y su intercambio por GTP a la subunidad  $\alpha$ , que queda ahora activada, disociándose de las subunidades  $\beta$ , y  $\gamma$ , provocando la activación de la enzima fosfolipasa C (PLC), que transforma los fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato ( $PIP_2$ ) de la membrana celular en inositol 3,4,5-trifosfato ( $PI_3$ ) y diacilglicerol (DAG) (Cooper, 2002). El  $IP_3$  estimula la salida de  $Ca^{2+}$  de los depósitos en el retículo sarcoplásmico hacia el citoplasma celular. Allí el  $Ca^{2+}$  se une a la proteína reguladora calmodulina (CaM), y en presencia de varios cofactores como la dihidrotetrabiopterina ( $BH_4$ ), la eNOS se disocia de la caveolina 1, produciéndose su dimerización o acoplamiento, y por tanto su activación para la producción de NO (Nathan y Xie, 1994; Fleming y Busse, 2003).

Sin embargo, la insulina induce la activación de la eNOS mediante su fosforilación y de forma independiente de los movimientos de calcio intracelulares, cascada de señalización intracelular que ha sido dilucidada en células endoteliales de cultivos primarios. Esta vía requiere la activación del receptor de insulina cuyo dominio intracelular posee actividad tirosina cinasa fosforilando su propio sustrato, llamado sustrato del receptor de insulina (IRS), que a su vez, también posee actividad cinasa produciendo la fosforilación de la subunidad p85 de la enzima fosfatidil inositol-3-cinasa (PI3K). La PI3K posee una subunidad reguladora y otra subunidad catalítica p110. Al fosforilarse la subunidad reguladora p85 se une a IRS, generando la activación aldostérica de la subunidad catalítica p110, la cual fosforila el fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato ( $PIP_2$ ), que se encuentra formando parte de la bicapa lipídica de la membrana celular, y transformándolo en fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato ( $PIP_3$ ) (Cantley, 2002). A continuación el  $PIP_3$  se une a una proteína cinasa dependiente de  $PIP_3$  (PDK-1) fosforilándola. A su vez, la PDK-1 produce la fosforilación de una isoforma de la proteína cinasa C, denominada Akt (Alessi et al., 1997) que tiene actividad serin-treonin cinasa. La Akt fosforila la proteína

eNOS sobre la Ser<sup>1177</sup> activándola, de forma que comienza la síntesis de NO, agente generado en las células endoteliales que media la dilatación de los vasos sanguíneos. La fosforilación de eNOS en la posición Thr<sup>495</sup>, sin embargo, produce una acción inhibitoria de la enzima (Mount et al., 2007). Esta ruta de activación de la eNOS utilizada por la insulina, y también por otros factores químicos y mecánicos como los factores de crecimiento y el “shear stress” a nivel del endotelio vascular (Dimmeler et al, 1999).

*Receptor de insulina (IR):* Se expresa en la superficie de células endoteliales humanas en el orden de unas diez veces menos que el receptor para el factor de crecimiento insulínico (IGF) (IGF-IR), siendo aproximadamente unas 40000 unidades por célula para IR y de unas 400000 unidades para IGF-IR (Zeng y Quon, 1996). Además se ha observado que IGF-IR y los receptores híbridos IGF-IR/IR, poseen baja afinidad por la insulina (Nitert et al., 2005). Las concentraciones fisiológicas de insulina (100-500 pM) activan selectivamente el receptor de insulina, activando su función tirosina cinasa que desencadena la activación de la cascada que se detalla a continuación que en última instancia induce la fosforilación y activación de eNOS, mientras que concentraciones suprafisiológicas de insulina activan el IGF-IR y receptores híbridos (Zeng y Quon, 1996; Li et al., 2005). El primer estudio que demostró que la insulina estimula directamente la producción de NO en células endoteliales se realizó en células endoteliales venosas de cordón umbilical humano (HUVEC) (Nathan y Xie, 1994).

*Sustrato del receptor de insulina (IRS):* IRS-1 es el principal sustrato del receptor de insulina, y se observó que su sobreexpresión en células endoteliales de aorta bovina (BAEC), incrementaba hasta 3 veces la producción de NO en respuesta a la insulina (Montagnani et al., 2002b), poniendo de manifiesto su participación en esta vía de señalización. Existe el IRS-2, aunque su contribución a la producción de NO en el endotelio no se conoce bien. Sin embargo, IRS-1 es un componente necesario en la vía de señalización activada por la insulina, ya que es indispensable para la activación de PI3K.

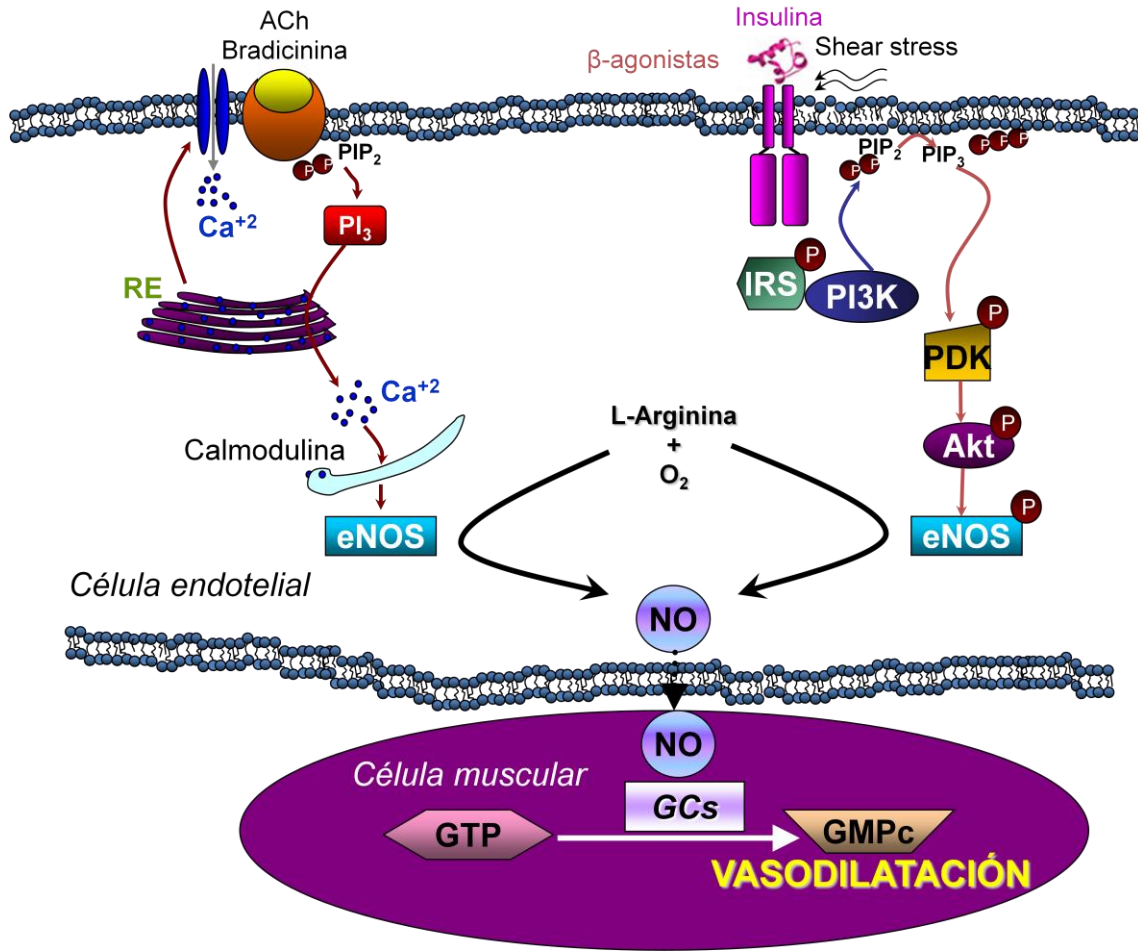
*Fosfatidil inositol 3-fosfato cinasa (PI3K):* Es la siguiente enzima activada en esta cascada de señalización intracelular, con un papel esencial en la activación de eNOS, que se demostró en HUVEC preincubadas con wortmanina, un inhibidor de PI3K que bloqueaba completamente la producción de NO en respuesta a la insulina (Zeng y Quon, 1996; Hartell et al., 2005). Además, la alteración de su dominio regulador p85, inhibe sustancial y significativamente la producción de NO en HUVEC (Zeng et al., 2000). También existen estudios que demuestran que la expresión de eNOS en células endoteliales se ve incrementada por las

acciones de la insulina a través de PI3K, y que la inhibición de la vía de las MAPK incrementa este efecto sobre la eNOS (Kuboki et al., 2000; Montagnani et al., 2002a).

*PDK-1:* Es el siguiente paso en la cascada por debajo de la PI3K, y se ha observado que su sobreexpresión en BAEC duplica la producción de NO en respuesta a la insulina, así como que el defecto en su expresión bloquea la producción de NO inducida por insulina (Montagnani et al., 2002b), lo que sugiere que es otro componente esencial en esta vía de señalización de la insulina para la producción de NO a nivel endotelial.

*Akt:* Esta enzima se activa en respuesta a la fosforilación de PDK-1, y es la encargada directa de fosforilar a la eNOS en la posición Ser<sup>1177</sup>, activándola (Dimmeler et al., 1999). La fosforilación de Akt en su residuo Ser<sup>1179</sup> es absolutamente esencial para la activación de eNOS, y así, células mutadas que expresan eNOS pero tienen alterado el sitio de fosforilación de Akt, son incapaces de producir NO en respuesta a la insulina (Montagnani et al., 2001). El pretratamiento de células con un compuesto quelante de calcio no inhibe la capacidad de la insulina para fosforilar la eNOS y el tratamiento con insulina no modifica los niveles de calcio intracelular en células endoteliales (Montagnani et al., 2001; Hartell et al., 2005), lo que sugiere que la producción de NO inducida por insulina es independiente del calcio.

*Papel de la proteína "heat shock" 90 (HSP90):* La asociación de esta proteína con la eNOS es indispensable para la producción de NO (Fleming y Busse, 2003), ya que a pesar de que esta activación es independiente del calcio, la eNOS necesita unirse a CaM, lo que requiere la actuación de HSP90. Se cree que el mecanismo de acción es formando un complejo ternario eNOS-HSP90-Akt que en última instancia produce la fosforilación de eNOS en la Ser<sup>1177</sup> (Fleming y Busse, 2003; Takahashi y Mendelsohn, 2005).



**Figura IV. Representación de las dos posibles vías de activación de la eNOS a nivel de la célula endotelial (Izquierda: vía clásica. Derecha: vía dependiente de PI3K/Akt), y mecanismo por el cual el NO formado produce vasodilatación a nivel de la célula del músculo liso.**

Además de mediar la acción vasodilatadora de la insulina, la vía de señalización de la PI3K está implicada en las acciones metabólicas de la hormona como son la captación de glucosa por los tejidos, la glucogenogénesis y la gluconeogénesis a nivel del hígado, músculo esquelético y tejido adiposo (Muniyappa et al., 2007) (Figura V). En los seres humanos, la infusión intravenosa de insulina estimula el reclutamiento capilar, la vasodilatación y el incremento del flujo sanguíneo dependientes de NO (Vincent et al., 2004; Muniyappa et al., 2007). Estas acciones vasculares juegan un papel esencial en la distribución de insulina y de glucosa en el músculo esquelético, que depende del flujo sanguíneo al músculo, así como del área de superficie capilar y de la permeabilidad.



El reclutamiento capilar en el músculo esquelético consiste en que la unidad microvascular, un grupo de lechos capilares compuestos por una arteriola terminal simple que es la unidad funcional más pequeña para controlar el flujo sanguíneo en el músculo esquelético, sufren una dilatación máxima sin modificar, inicialmente, el flujo de sangre total. Utilizando imagen por ultrasonidos del músculo esquelético, y administrando una infusión de microesferas de contraste, se pudo observar en tiempo real la instauración del reclutamiento capilar como respuesta a concentraciones fisiológicas de insulina durante las 2 primeras horas después de su administración y previa al cambio en el flujo sanguíneo total. El pretratamiento con N<sup>6</sup>-nitro-L-arginina (L-NOARG), un inhibidor de la NOS, atenuó este aumento del volumen capilar en un 50-70%. Posteriormente se produjo un aumento del flujo sanguíneo total en las extremidades, independiente de los cambios en el metabolismo de los carbohidratos. Todas estas acciones vasodilatadoras producidas en respuesta a la insulina, son mediadas por NO (Dawson et al., 2002; Vincent et al., 2002). En las arteriolas que nutren a los miocitos, se han observado respuestas diferentes a la insulina dependiendo del segmento del vaso, debido a diferencias en la sensibilidad a la insulina. Las acciones vasodilatadoras de la hormona son mayores en vasos pequeños. Cuando hay una elevada actividad simpática, las arteriolas distales relajan en respuesta a la insulina, mientras que las arteriolas más proximales sufren una vasoconstricción (Marshall, 1982).

Los inhibidores de la NOS bloquean el reclutamiento capilar mediado por insulina y causan una reducción concomitante de un 40% en la captación de glucosa (Vincent et al., 2002, 2004; Muniyappa et al., 2007). Así, las acciones metabólicas de la insulina dependientes de PI3K directamente promueven la captación de glucosa en el músculo esquelético estimulando la translocación de los transportadores de glucosa sensibles a insulina (GLUT-4); al mismo tiempo, las acciones vasodilatadoras dependientes de esta vía incrementan el flujo sanguíneo y el reclutamiento capilar, lo que contribuye a promover la captación de glucosa acoplando así la homeostasis metabólica y hemodinámica (Muniyappa et al., 2007).

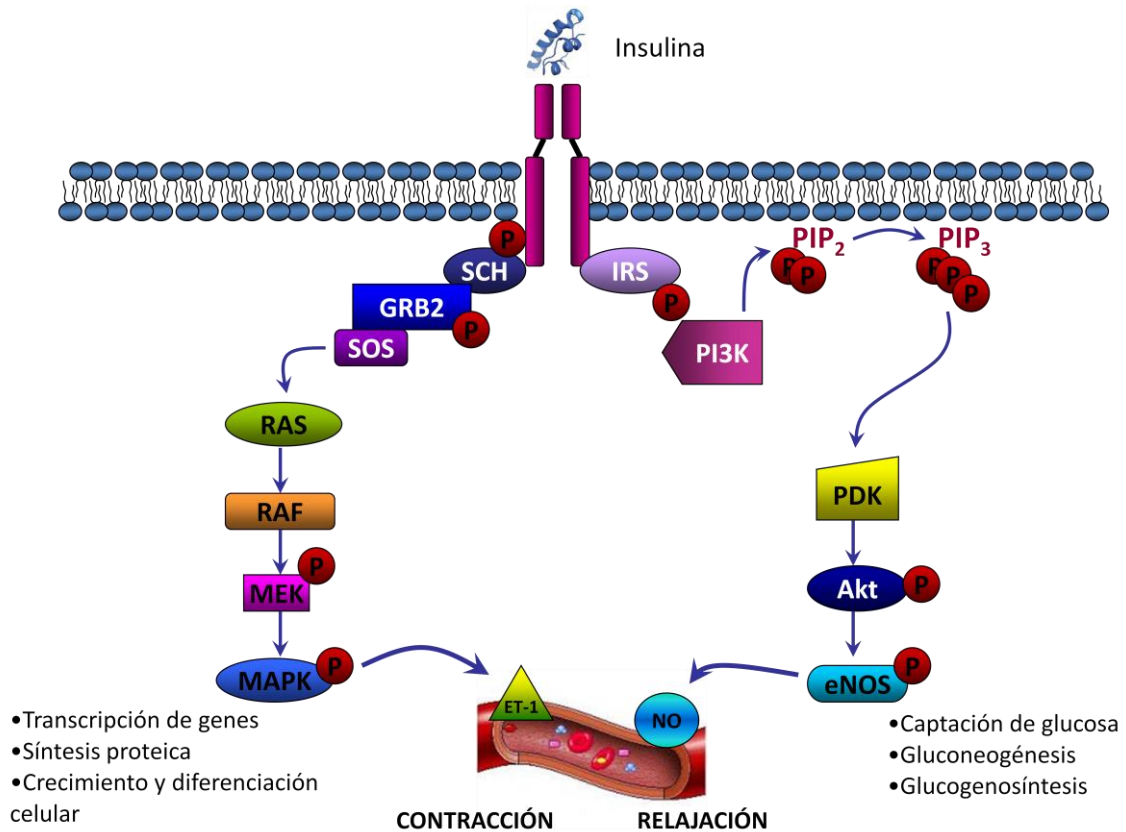
### 1.2.2. Formación de ET-1: acción vasoconstrictora de la insulina

Además de la vía de señalización de la PI3K/Akt/eNOS, la unión de la insulina a su receptor activa la fosforilación de la proteína Shc, uniéndose al dominio SH2 (de homología 2 con Src) de la proteína Grb-2 (Gustafson et al., 1995), que a su vez produce la activación factor de intercambio SOS y la unión de guanililtrifosfato (GTP) a la proteína Ras (proteína de unión a GTP). Esto inicia una cascada de fosforilación de cinasas, en la que están involucradas la serina-treonina-cinasa Raf, la MEK (de MAPK y ERK) y la MAPK (proteína cinasa activada por mitógenos). Dentro de la familia de las MAPKs se encuentra la ERK: cinasa regulada por señales extracelulares (Nystrom y Quon, 1999). Esta vía activada por insulina regula acciones biológicas de crecimiento, mitogénesis y diferenciación celular, y también media la formación de endotelina (ET)-1 a nivel del endotelio vascular, produciendo la contracción de los vasos sanguíneos, lo que se opone a las acciones vasodilatadores del NO (Marasciulo et al., 2006).

Estudios recientes han demostrado que en los vasos sanguíneos que la insulina y otras hormonas actúan estimulando la secreción de ET-1 por la vía dependiente de MAPK, y no por la vía dependiente de PI3K (Potenza, 2005, 2009). Así, en los seres humanos, la infusión periférica de insulina incrementa los niveles periféricos de ET-1 y el bloqueo de los receptores de ET-1 potencia las acciones vasodilatadoras de la hormona dependientes del NO (Cardillo et al., 1999; Muniyappa et al., 2007). Confirmando la dependencia de la producción endotelial de ET-1 de la vía de la MAPK, el bloqueo de esta cinasa *in vitro* inhibe la vasoconstricción a la insulina en arteriolas del músculo esquelético (Cardillo et al., 1999; Eringa et al., 2004) y en aorta de ratas Zucker obesas (Yang et al., 2007), en las cuales la sensibilidad a la insulina está disminuida con respecto a animales sanos. Cualquier modificación en el balance entre las acciones vasodilatadoras y vasoconstrictoras de la insulina provocada por un deterioro de la señalización en la vía PI3K, puede provocar importantes patologías vasculares como resistencia a la insulina o disfunción endotelial (Yang et al., 2007; Eringa et al., 2007).

La ET-1 disminuye el reclutamiento capilar y la captación de glucosa estimulados por insulina en el músculo esquelético (Ross et al., 2007; Muniyappa et al., 2007). Sin embargo, como el NO inhibe la producción y acciones de la ET-1 (Kelly et al., 2004), bajo condiciones fisiológicas se considera que las acciones de la ET-1 producida por la estimulación del endotelio por insulina están probablemente contrarrestadas por la producción de NO inducido por la hormona (Muniyappa et al., 2007).

Además, en lo referente a la vía dependiente de MAPK, la insulina estimula la expresión endotelial del inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1) y de moléculas de adhesión celular (ICAM-1, VCAM-1 y E-selectina) a través de dicha vía (Montagnani et al., 2002a).



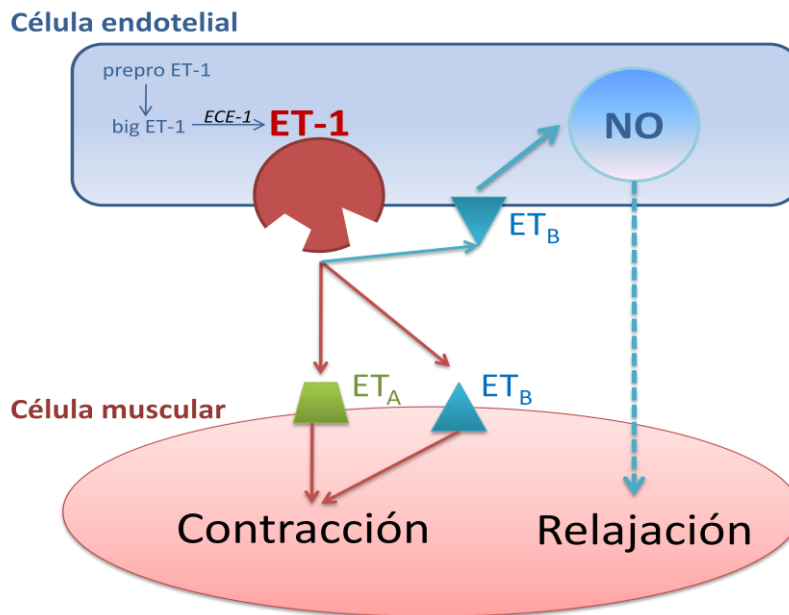
**Figura V. Acciones de la insulina**  
(Adaptación de: Muniyappa et al, 2007)

#### 1.2.2.1. Papel de la ET-1 en la fisiología y fisiopatología vascular

A menudo se refiere la disfunción endotelial a situaciones donde los efectos vasodilatadores del endotelio se encuentran comprometidos, principalmente por una disminución en la producción y/o disponibilidad de NO. Sin embargo otra alteración importante en la disfunción endotelial es el incremento en la producción y actividad biológica de ET-1, potente vasoconstrictor y de actividad pro-inflamatoria sintetizado por las células del endotelio vascular (Böhm y Pernow, 2007).

La síntesis de ET-1 comienza con la inducción del ARNm de la pre-pro-ET-1, que se convierte en un péptido intermediario de 39 aminoácidos, denominado pro-endotelina (*big* ET-1), mediante una endopeptidasa específica. Por último, la *big* ET-1 se transforma en ET-1 a través de una metaloproteinasa llamada la enzima convertidora de endotelina (ECE) (Figura VI). Existen tres isoformas distintas de endotelina, ET-1, ET-2 y ET-3. Bajo condiciones fisiológicas, la ET-1 es producida en pequeñas cantidades por las células endoteliales, con el fin de mantener el tono vascular y también como mediador autocrino y paracrino. Sin embargo, bajo condiciones patológicas, la producción de ET-1 se ve estimulada en diferentes tipos celulares como células endoteliales, del músculo liso, miocitos cardíacos (Ito H et al., 1993) y células inflamatorias como macrófagos (Ehrenreich et al., 1990) y leucotrienos (Sessa et al., 1991).

La ET-1 ejerce sus acciones uniéndose a dos subtipos de receptores transmembrana acoplados a proteínas G, los ET<sub>A</sub> y los ET<sub>B</sub>. Estos receptores han sido identificados en distintos tejidos, incluyendo las células musculares lisas y las células endoteliales de los vasos sanguíneos (Hori et al., 1992), aunque existen diferencias en los patrones de distribución tisular entre los receptores ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub>. El receptor ET<sub>A</sub> se localiza principalmente en el músculo liso vascular donde media una potente vasoconstricción, aunque también puede inducir indirectamente efectos vasoconstrictores generando tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) (Taddei y Vanhoutte, 1993). El receptor ET<sub>B</sub> se localiza principalmente en las células endoteliales, pero también puede estar presente en el músculo liso vascular. La estimulación de los receptores ET<sub>B</sub> endoteliales libera NO y prostaciclina, induciendo vasodilatación (DeNucci et al., 1988), mientras que la estimulación de los receptores ET<sub>B</sub> del músculo liso vascular produce vasoconstricción. Por ello, el efecto neto producido por la ET-1 va a ser determinado por la localización y balance entre los receptores ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub>. (Figura VI). Se ha observado además que en condiciones patológicas de disfunción endotelial se incrementa la expresión de los receptores ET<sub>B</sub> localizados en el músculo liso vascular, mediadores de vasoconstricción (Bauer et al., 2002; Rondelet et al., 2003).



**Figura VI. Localización y acción de los receptores de endotelina  $ET_A$  y  $ET_B$  en la pared vascular.**  
(Adaptación de: Böhm F y Pernow J, 2007).

Se han investigado los mecanismos comunes a la disfunción vascular y a la endotelina, observándose que el bloqueo del receptor  $ET_A$  mejora la biodisponibilidad de NO (Vehaar et al., 1998) o incluso se incrementa la actividad de la eNOS (Taner et al., 2001) en animales hipercolesterolémicos, donde además, la actividad de la NOS de células endoteliales de aorta se encontró incrementada en mayor proporción por el bloqueo combinado  $ET_A/ET_B$  que por el bloqueo  $ET_A$  simplemente (Taner et al., 2001). Por todo ello, la ET-1 podría disminuir la biodisponibilidad de NO interfiriendo en la expresión y actividad de la eNOS.

Se han propuesto también las especies reactivas de oxígeno (ROS) como vínculo de unión entre la ET-1 y el NO, ya que la ET-1 incrementa la producción de aniones superóxido (Galle et al., 2000; Mohazzab et al., 1994), compuestos que disminuyen la actividad de NO al transformarlo en peroxinitrito. Las ROS también pueden interferir en otros mecanismos vasodilatadores derivados del endotelio como son las prostaciclina o el factor hiperpolarizante derivado del endotelio (Félétou y Vanhoutter, 2006). La ET-1 deteriora las relajaciones dependientes del endotelio en aorta de ratas sanas y diabéticas mediante la producción de superóxido, y también altera la actividad de la vía de PI3K, lo que mejora mediante el tratamiento con un antagonista  $ET_A/ET_B$  (Kanie y Kamata, 2002). En humanos, la ET-1 estimula la formación de aniones superóxido en *bypass* venosos de pacientes diabéticos (Ergul et al., 2005). Por tanto la ET-1 incrementa el estrés oxidativo mediante la producción de especies reactivas de oxígeno, y que el antagonismo de los receptores de ET ha sido propuesta como

una alternativa terapéutica por incrementar la disponibilidad de NO y disminuir la formación de radicales libres, mejorando así la disfunción endotelial en diferentes estados de enfermedad cardiovascular.

Además de su acción vasomotora directa, la ET-1 se encuentra implicada en procesos inflamatorios de la pared vascular, ya que en concentraciones subnanomolares activa macrófagos que liberan mediadores de la inflamación y quimiotácticos como el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), la interleucina (IL)-1, la IL-6 o la IL-8, las cuales tienen gran importancia en procesos ateroscleróticos. La IL-6 además se encuentra implicada en el desarrollo de aterosclerosis y disfunción endotelial en humanos (Libby, 2002). La hipercolesterolemia también está asociada al deterioro en la vasodilatación dependiente del endotelio, así como a elevadas concentraciones plasmáticas y en tejidos de ET-1, lo que contribuye a la disfunción endotelial (Lerman et al., 1993). Existen además importantes interacciones entre las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y la ET-1, lo que podría cobrar gran importancia en procesos de aterogénesis, ya que la ET-1 incrementa la captación de LDL oxidadas, y las LDL oxidadas, a su vez estimulan la producción de ET-1 (Morawietz, 2002; Niemann, 2005). Incluso se ha observado que el bloqueo selectivo del receptor ET<sub>A</sub> atenúa el desarrollo de procesos ateroscleróticos (Barton et al., 2003). Estos datos sugieren que el bloqueo del receptor de ET-1 ejerce efectos anti-aterogénicos.

Katakam y colaboradores (2005) caracterizaron los receptores de ET en las arterias coronarias de la rata *Zucker*, donde la ET-1 indujo mayor contracción en ratas *Zucker lean* (RZL) que en ratas *Zucker* obesas (RZO) asociada a un incremento proporcional de  $[Ca^{2+}]_i$ . Estas contracciones disminuyeron en presencia de un antagonista del receptor ET<sub>A</sub>, sin embargo el tratamiento con el inhibidor de los receptores ET<sub>B</sub>, así como con un inhibidor de la NOS, restauraron la vasoconstricción en arterias de RZO. La expresión de los receptores de ET no se vio alterada bajo condiciones de Síndrome Metabólico. Por ello se puede deducir que la respuesta contráctil a la ET-1 está disminuida en arterias coronarias de RZO, y que existe un incremento en la generación de NO dependiente de ET<sub>B</sub>, acoplado a la disminución de la  $[Ca^{2+}]_i$  que probablemente sea responsable de la hiporeactividad a la ET-1 (Katakam et al., 2005).

Los estudios sobre la expresión de los receptores de la ET en la pared vascular durante estados patológicos, sugieren que el bloqueo combinado de ambos receptores es más beneficioso que el bloqueo selectivo de ET<sub>A</sub>, ya que el bloqueo de ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub> parece inducir mayor efecto vasodilatador que el bloqueo de ET<sub>A</sub> únicamente, y así antagonizar las acciones patológicas de la ET-1 en la enfermedad cardiovascular. Por ello, los receptores ET<sub>B</sub> están

cobrando gran importancia en distintos desórdenes como hipertensión, aterosclerosis o procesos de resistencia a insulina, y el bloqueo combinado de los receptores ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub> podría ser una alternativa terapéutica que mejore la función endotelial y la sensibilidad a la insulina.

### 1.2.3. Acciones de la insulina en el músculo liso vascular

Numerosos trabajos han descrito las acciones vasculares y vías de señalización intracelular de la insulina a nivel de las arterias del músculo esquelético, tejido donde se localiza el 80-90% de la captación de la glucosa estimulada por insulina, y por ello constituye una de las primeras dianas para las acciones vasculares de esta hormona *in vivo*. Eringa y colaboradores (2002, 2007) han estudiado ampliamente las acciones de la hormona en el lecho vascular del músculo cremáster, comprobando que la insulina no induce cambios significativos en el diámetro de estas arterias. Sin embargo, utilizando un inhibidor específico de la NOS desenmascararon el efecto vasoconstrictor de la ET-1 dependiente de la insulina a dosis fisiológicas de la hormona. Mediante el uso de un antagonista no selectivo del receptor de ET-1, observaron la liberación de NO y el efecto vasodilatador a dosis farmacológicas de insulina. El tratamiento con un inhibidor de la enzima PI3K también desenmascara la producción de ET-1 al inducir vasoconstricción dependiente de la hormona, lo que demuestra la implicación de la vía de la PI3K en la producción de un compuesto vasodilatador. Este hecho es importante debido a que una de las características de los estados de resistencia a insulina consiste en el deterioro de la vía de señalización intracelular dependiente de la PI3K (Eringa et al., 2002).

En las células del músculo liso vascular, se ha descrito que la insulina disminuye la contractibilidad regulando el aumento de Ca<sup>2+</sup> citosólico producido por agonistas a través de canales de Ca<sup>2+</sup> voltaje-dependientes (Standley et al., 1991; Kahn et al., 1993, 1995; Touyz et al., 1994, 1995; Muniyappa et al., 2007). El tratamiento de las células del músculo liso vascular con insulina provoca una disminución en el Ca<sup>2+</sup> intracelular y acelera dicha disminución al inhibir la entrada del mismo, y al mismo tiempo estimular su salida (Standley et al., 1991; Muniyappa et al., 1997). La insulina produce una hiperpolarización de la membrana, estimula la bomba de sodio ATPasa y activa canales K<sup>+</sup> dependientes de Ca<sup>2+</sup>, reduciendo así la entrada de Ca<sup>2+</sup> por canales voltaje-dependientes (Berweck et al., 1993; Tirupattur et al., 1993; Wiecha et al., 1998). La insulina también ejerce su acción activando las bombas de Ca<sup>2+</sup> de la membrana y del retículo sarcoplásmico, disminuyendo así las concentraciones de Ca<sup>2+</sup> citoplasmático (Kim y Zemel, 1993). Las acciones de la insulina sobre el Ca<sup>2+</sup> intracelular en el

músculo liso vascular son atenuadas por inhibidores de las tirosina cinasas (Touyz y Schiffrin, 1996), y también de la enzima NOS (Kahn et al., 1997), por lo que es probable que la activación de la vía PI3K/Akt/NOS por la insulina contribuya a la regulación de los descensos de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y la reducción del tono vasoconstrictor.

La insulina posee también acciones a nivel del músculo liso vascular alterando la actividad de las fosfatasas de cadenas ligeras de miosina (MLC) a través de las enzimas Rho-kinasa (RhoK) y fosfocinasa C (PKC) (Begum et al., 2000).

Por otra parte, se ha demostrado que la insulina aumenta los niveles y la actividad no sólo de eNOS, sino también de la isoforma inducible de la enzima iNOS, y con ello la producción de NO dependiente de GMPc en las células de músculo liso vascular (Begum et al., 1998; Trovati et al., 1996, 1999; Bergandi et al., 2003). Estos hallazgos sugieren que la producción de NO por la insulina en el músculo vascular podría regular de forma autocrina las acciones vasodilatadoras de la hormona.

#### 1.2.4. Acciones de la insulina en el corazón

A pesar de que la acción de la insulina en el metabolismo de los sustratos está bien estudiada, no son muchos los datos que existen acerca de las acciones de la insulina sobre el lecho arterial coronario, aunque se sabe que esta hormona es un potente vasodilatador periférico y también en el miocardio de individuos sanos.

Estudios iniciales en perros normales y alimentados con una dieta rica en grasas, mostraron, que en perros normales, la infusión de insulina incrementó el flujo coronario y produjo vasodilatación, mientras que en perros con sobrepeso, esta relajación se perdía (Rocchini et al., 1996). En el estudio inicial de McNulty y colaboradores (2000), se evaluó el flujo sanguíneo miocárdico en pacientes sometidos a angiografía, y también el metabolismo oxidativo, en respuesta a la infusión intracoronaria de insulina, observándose que la elevación fisiológica de la insulina plasmática incrementaba el flujo sanguíneo coronario en ausencia de incrementos de la demanda o consumo de  $\text{O}_2$ , lo que sugiere una reducción primaria del tono coronario.



El flujo coronario está estrechamente relacionado con el consumo de oxígeno por el miocardio, por lo que existe una estrecha regulación del mismo entre el estado reposo y de trabajo cardíaco. Los efectos inotrópicos y cronotrópicos de la insulina aumentan la demanda de oxígeno por el miocardio (Baron y Brechtel, 1993; Ter Maaten et al., 1998), y por eso, directamente se incrementa el flujo sanguíneo coronario. Para evitar los cambios inducidos por la insulina en la contractilidad del ventrículo izquierdo (efectos inotrópicos) y de la frecuencia cardíaca (efectos cronotrópicos), se han utilizado  $\beta$ -bloqueantes, aunque estos agentes podrían tener efectos directos sobre los  $\beta$ -receptores de las arterias coronarias (Opie, 1998). Por el contrario, en condiciones de reposo, durante la hiperemia, el control metabólico del flujo está desacoplado, lo que permite probar el efecto de la insulina sobre otros parámetros como la función endotelial o el control neuronal.

La insulina regula el metabolismo cardíaco modulando el transporte de glucosa, la glucólisis, la síntesis de glucógeno, el metabolismo lipídico, la síntesis proteica, el crecimiento, la contractilidad y la apoptosis de los cardiomiocitos (Abel, 2008). A nivel vascular, la acción vasodilatadora de la insulina sobre la circulación coronaria incrementa la perfusión del miocardio (Sundell et al., 2002a; McNulty et al., 2000). La oxidación de los ácidos grasos aporta aproximadamente un 70% de la energía requerida por el corazón, y la glucosa y lactosa aportan el 30% restante para la producción de ATP. La insulina estimula la captación de glucosa por los cardiomiocitos, aumentando la exposición al exterior del transportador de glucosa GLUT-4. Los niveles de glucosa basales, sin embargo, se obtienen por los transportadores GLUT-1, que se mantienen constantes en la membrana plasmática, a través de la vía de señalización dependiente de PI3K/Akt, produciendo así la acumulación de glucógeno y una inhibición simultánea de la glucogenólisis (Ouwens et al., 2005).

La insulina produce un aumento de la contractilidad cardíaca asociado al aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático, procedente del exterior y del retículo sarcoplásmico. Se ha visto que los inhibidores de la PI3K, como wortmanina o LY-294002, inhiben estos efectos inotrópicos de la insulina a nivel de los cardiomiocitos (Maier et al., 1999, McDowell et al., 2004). La sobreexpresión de Akt en los miocitos cardíacos se asocia con un incremento de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al citoplasma a través de los canales tipo L, y también liberándolo de sus reservorios. Si esta sobreexpresión es crónica deriva en fallo cardíaco (Latronico et al., 2004; Rota et al., 2005).

La vía de PI3K/Akt genera factores de crecimiento de los cardiomiocitos como GSK3 $\beta$  y FOXO, de tal forma que la sobreexpresión de Akt también produce hipertrofia y disfunción, y estos cardiomiocitos hipertróficos son regulados por otros factores producidos por la vía de MAPK (Latronico et al., 2004).

A nivel cardiaco, la insulina estimula de forma inicial un reclutamiento capilar, que tarda aproximadamente entre 30 y 60 minutos en hacerse efectivo. A continuación, pasadas las 2 horas de su liberación, comienza a producir una respuesta de vasodilatación en los grandes vasos. Las acciones cardiovasculares de la insulina consisten en una integración de ambas respuestas (Vincent et al., 2002).

Aunque existen muchas técnicas de medida del flujo coronario, el estudio de los efectos vasodilatadores de la insulina en el corazón es complicado, y la tomografía por emisión de positrones (PET) es la única técnica no invasiva que proporciona una cuantificación del flujo miocárdico global y regional en ml/min/g (Camici, 2000). Algunos estudios previos (Iozzo et al., 2002; Katakam et al., 2005) han investigado las acciones vasculares de la insulina en arterias coronarias debido a su gran importancia y a su implicación en la enfermedad arterial coronaria que con frecuencia sufren los individuos con diabetes mellitus tipo 2. Así, utilizando PET para la determinación del flujo sanguíneo coronario en voluntarios humanos, se observó que la hiperinsulinemia fisiológica incrementa el flujo sanguíneo coronario, especialmente en aquellas regiones del miocardio donde la hormona estimula la captación de glucosa (Iozzo et al., 2002a). Sundell y colaboradores (2002a) demostraron también que la insulina es capaz de incrementar el flujo sanguíneo hiperémico miocárdico de forma dosis-dependiente, y esta respuesta estuvo correlacionada con la captación total de glucosa del cuerpo. Estos hallazgos han llevado a evaluar el posible efecto beneficioso del tratamiento con insulina en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 y con enfermedad arterial coronaria, ya que la mortalidad se ve significativamente reducida con una terapia intensiva de insulina tras sufrir un infarto de miocardio (Lautamäki et al., 2006).

Los mecanismos por los cuales la insulina produce vasodilatación están bien caracterizados, aunque principalmente en la vasculatura periférica, y han sido bien descritos en apartados anteriores. Algunos estudios *in vitro* han investigado también la acción de la insulina en el lecho coronario. Oltman y colaboradores (2000) demostraron que tanto la insulina como el IGF-I inducen vasodilatación en arterias coronarias de conducción y en microvasos coronarios caninos, sin embargo, los mecanismos responsables de esta relajación

resultaron ser diferentes, ya que la insulina y el IGF-I indujeron una modesta vasodilatación en las arterias coronarias de conducción (de mayor calibre), dependiente de la ciclooxigenasa (COX) y de la NOS, mientras que esta relajación fue mucho más pronunciada en los microvasos coronarios, independiente de la COX y de la NOS, y mediada por la hiperpolarización inducida por canales de  $K^+$ . Otros autores describieron que la insulina y el IGF-I produjeron relajaciones, independientes del endotelio, del 28 y del 25 % respectivamente, en arterias coronarias de conductancia porcinas precontraídas con endotelina, y los canales de  $K^+$  en el músculo liso se encontraron involucrados en dicha respuesta (Hasdai et al., 1998).

Existe un estudio en células endoteliales coronarias humanas que demuestra que la insulina activa la vía de la PI3K/Akt/eNOs, y además, es inactivada por condiciones de hiperglucemia ya que se activa la vía de las hexosaminas, produciendo la O-gluco-N-acilación de las enzimas de la vía de PI3K/Akt/eNOS, deteriorando en última instancia, la producción de NO (Federici et al, 2002).

Se demostró que la dexametasona no abolió la vasodilatación a la insulina en arterias coronarias, indicando que el sistema nervioso simpático no juega ningún papel en la regulación de las acciones de la hormona sobre la perfusión cardiaca de sujetos sanos (Laine et al., 2000). El tratamiento con  $\beta$ -bloqueantes no tuvo efecto sobre la vasodilatación inducida por insulina en sujetos sanos (Liang et al., 1982).

## 2. RESISTENCIA VASCULAR A LA INSULINA

La resistencia a la insulina se define clásicamente como una disminución de la sensibilidad y/o respuesta a las acciones metabólicas de la insulina que estimulan la captación de glucosa por los tejidos. Es una característica distintiva importante de desórdenes metabólicos como la diabetes tipo 2, la obesidad, la intolerancia a la glucosa y las dislipidemias, y constituye además un componente presente en enfermedades cardiovasculares como la hipertensión, la enfermedad arterial coronaria y la aterosclerosis. Todas estas condiciones patológicas se caracterizan por la existencia de disfunción endotelial y, de forma inversa, la disfunción endotelial está también presente en las alteraciones metabólicas anteriores (Bonetti et al., 2003). Así, la disfunción endotelial frecuentemente coexiste con la resistencia a insulina, y los factores causales compartidos interactúan a múltiples niveles, generando relaciones recíprocas entre ambos procesos (Kim et al., 2006).

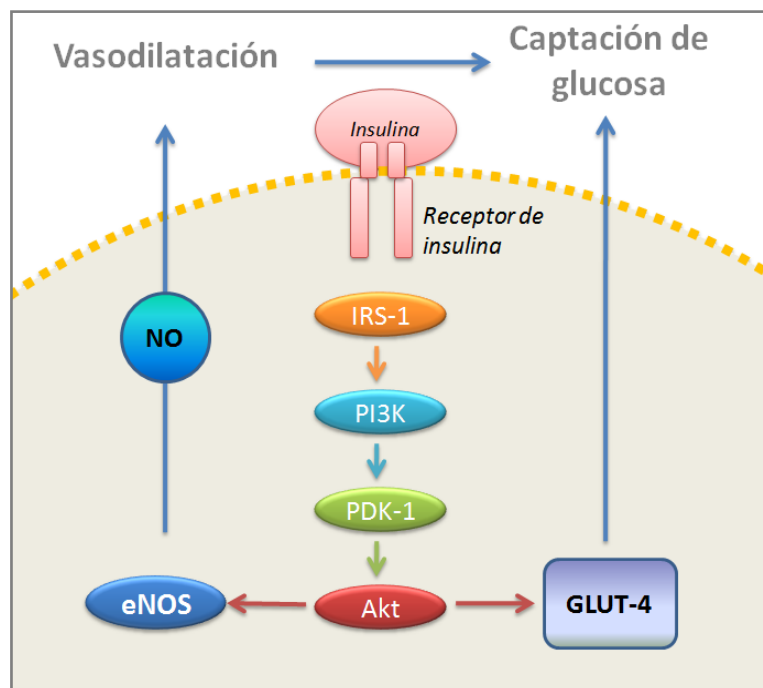
La resistencia a la insulina produce un incremento compensador en la secreción de insulina, generando hiperinsulinemia, y en última instancia fallo de las células  $\beta$  del páncreas que provoca hiperglucemia en ayuno. Cuando la secreción de insulina no es capaz de compensar la resistencia que se opone a las acciones de la hormona, se desencadena el desarrollo de la diabetes mellitus tipo 2, con lo cual se altera la utilización y el almacenamiento de los hidratos de carbono, preteínas y lípidos, se incrementa la glucemia y se induce un exceso en la secreción de insulina. (Kahn, 1994). Se han realizado estudios en ratones con depleción genética del receptor de insulina específicamente en el hígado (LIRKO), poniendo de manifiesto que la resistencia a la insulina en el hígado está ampliamente implicada en el desarrollo de intolerancia a la glucosa e hiperglucemia durante el ayuno. Además estos ratones también desarrollan hiperplasia de las células  $\beta$ -pancreáticas, hiperinsulinemia y un menor aclaramiento de la insulina (Michael et al., 2000). Sin embargo, se ha observado que en este modelo animal, la diabetes se corrige con la edad, sugiriendo algún mecanismo compensador, que probablemente está relacionado con el comienzo temprano de la resistencia a la insulina en este modelo animal, limitando la compresión del impacto de la resistencia a la insulina hepática en la patogénesis del la diabetes mellitus tipo 2. Por ello, el grupo de investigación de Benito y colaboradores (2009) crearon un modelo de ratón con deficiencia hepática del RI inducible (iLIRKO), con el fin de estudiar mejor la resistencia hepática a la insulina durante la diabetes mellitus tipo 2. Este nuevo modelo experimental, a diferencia del anterior, desarrolló alteraciones en las vías de señalización de la insulina proporcionales a la pérdida de la expresión del RI, tanto en la cascada dependiente de la Akt como en la de las MAPK, y en

ratones con depleción completa del receptor, la insulina fue incapaz de activar estas vías (Escribano et al., 2009). A pesar de que la depleción del RI se encuentra a nivel hepático, y no está alterada su expresión en otros tejidos, sí se ha observado el deterioro progresivo en la actividad de las vías de señalización inducidas por la insulina en otros tejidos periféricos como el cerebro, músculo esquelético o tejido adiposo marrón, todos correlacionados con la severidad de la depleción del RI a nivel del hígado. Así, estos autores demuestran que los ratones *iLIRKO* desarrollan resistencia primaria a la insulina en el hígado, asociada con resistencia a la insulina secundaria en tejidos periféricos a lo largo de la vida del animal (Escribano et al., 2009). Además, en estudios recientes llevados a cabo por el mismo grupo demuestran que el fallo en los mecanismos compensadores en respuesta a la resistencia a la insulina agrava el daño vascular. Así, en ratones con deleción del receptor de insulina *BATIRKO* obesos con insulinemia normal no se desarrollan mecanismos compensadores y se altera la señalización de la insulina en hígado, tejido adiposo blanco y músculo esquelético, paralelamente al deterioro de la función endotelial y a un incremento de marcadores inflamatorios como  $\text{TNF-}\alpha$  o adiponectina. Sin embargo, en estadíos más avanzados en los cuales se incrementa la producción de insulina en respuesta a la resistencia a la hormona, como ocurre en los ratones *BATIRKO* obesos hiperinsulinémicos, se desarrollan mecanismos compensadores para mantener inalterada la señalización de insulina en hígado, tejido adiposo blanco y músculo esquelético, disminuyendo los marcadores de la inflamación y reinstaurándose la función endotelial normal (Gómez-Hernández et al., 2011).

En lo que respecta a la resistencia vasulcar a la insulina, un rasgo esencial es que está alterada de forma específica la vía de señalización dependiente de la PI3K, mientras que otras rutas de señalización, como la de Ras/MAPK, parecen no estar afectadas (Jiang et al., 1999; Cusi et al., 2000). Las implicaciones fisiopatológicas de esta alteración selectiva son importantes, ya que la resistencia metabólica a la insulina va acompañada de una hiperinsulinemia compensadora para mantener la glucemia. A nivel vascular, la hiperinsulinemia producirá un desequilibrio entre las acciones de la insulina dependientes de la vía PI3K (deprimidas) y las dependientes de la MAPK (no afectadas), favoreciendo las acciones prohipertensivas de la hormona mediadas por la vía MAPK incrementando así la vasoconstricción, la expresión de moléculas de adhesión y las acciones mitogénicas de la hormona (Montagnani et al., 2002a; Potenza et al., 2005).

Las causas de esta alteración metabólica y vascular podrían deberse tanto en componentes genéticos como en factores adquiridos, como son obesidad o estilo de vida

sedentario, que a menudo preceden a las alteraciones en la tolerancia a la glucosa y a la hiperglucemia (DeFronzo y Ferrannini, 1991). Por otra parte, la resistencia a la insulina metabólica es a menudo acompañada por dislipemia, la cual puede, a su vez, incrementar la resistencia a la insulina (Lann y LeRoith, 2009). A un nivel molecular, la resistencia metabólica a la insulina se genera por un deterioro en la vía de señalización dependiente de PI3K como diana metabólica directa de la insulina (Nystrom y Quon, 1999). Como se ha descrito en apartados anteriores, la activación de eNOS y la producción de NO en respuesta a la hormona requieren la activación de la vía IR/IRS-1/PI3K/Akt. Los pasos de la vía por encima de la activación de Akt, se solapan con las vías que median la captación de glucosa estimulada por la insulina en los tejidos diana donde la hormona ejerce sus efectos metabólicos (Saltiel y Kahn, 2001). La notable similitud entre la vía de señalización metabólica de la insulina, relacionada con la captación de glucosa, y la vía de señalización de la insulina relacionada con la vasodilatación, explica el deterioro paralelo de la translocación del transportador de glucosa GLUT-4 a nivel muscular y del tejido adiposo, y el deterioro en la producción endotelial de NO en la vasculatura, bajo condiciones de resistencia a la insulina (Kim et al., 2005) (Figura VII).



**Figura VII. Vías de señalización a la insulina compartidas en los tejidos metabólicos y vasculares.** La vía de señalización que activa la insulina al unirse a su receptor, activando IRS-1, PI3K, PDK-1 y Akt, regula la traslocación del transportador de glucosa GLUT-4 hacia la superficie celular en el tejido adiposo y músculo esquelético; y la misma vía de señalización en el endotelio regula la activación de la eNOS y producción de NO. Por ello los factores que alteran la vía, producen tanto resistencia metabólica a la insulina como disfunción endotelial. (Adaptación de: Potenza y Montagnani, 2008).

Existen evidencias experimentales y clínicas que respaldan el concepto de que alteraciones a cualquier nivel de la vía de señalización de PI3K inducen el deterioro de los efectos endoteliales inducidos por la insulina. Así, por ejemplo, en ratones modificados genéticamente en los que se elimina el IR específicamente en el endotelio (VENIRKO) se encuentra disminuida la expresión de la eNOS y la ET-1, y estos animales desarrollan resistencia a la insulina e incrementos en la presión arterial cuando son expuestos a dietas ricas en grasas (Vicent et al., 2003). De manera similar, ratones transgénicos con un receptor de insulina disfuncional en el endotelio (ESMIRO) muestran una reducción significativa de la biodisponibilidad de NO, secundaria al incremento de la generación de ROS, incluso en ausencia de un fenotipo metabólico de resistencia a la insulina (Ducan et al., 2008). Otro estudio en ratones con el gen que codifica para IRS-1 suprimido demuestra que estos animales no son resistentes a la insulina, pero sí sufren alteraciones en la vasodilatación dependiente del endotelio (Abe et al., 1998). En modelos animales de resistencia a la insulina metabólica con la vía de la PI3K alterada, está disminuida la vasodilatación dependiente del NO y del endotelio en respuesta a la insulina (Potenza et al., 2005), y se produce un incremento de la sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$  mediante la activación de la vía RhoA (Hopfner et al., 1998; Kanda et al., 2006; Naik et al., 2006). También se ha observado en humanos, que la mutación en la Thr<sup>1134</sup> del receptor de insulina, se asocia con desórdenes metabólicos y vasculares (Moller et al., 1990). Por otra parte, se estudió que un polimorfismo genético del IRS-1 está implicado en procesos de resistencia a insulina metabólica y asociado a disfunción endotelial (Federici et al., 2004). Además la fosforilación de la Akt y la eNOS está disminuida en arterias de pacientes con resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa, comparados con sujetos sanos (Okon et al., 2005). La expresión anormal y activación de las isoformas de las proteínas-quinasa C causadas por la resistencia a la insulina, pueden deteriorar la capacidad de la insulina de liberar NO endotelial, tanto directamente, a través de la fosforilación de IRS (Itani et al., 2002), como indirectamente, induciendo estrés oxidativo que activa c-Jun NH<sub>2</sub> terminal quinasa (JNK) (Ozcan et al., 2004). Se ha observado también que la sobreproducción de ROS a nivel endotelial es responsable, en parte, del deterioro en la función cardíaca y de la reducción en la vasodilatación estimulada por la insulina en modelos animales de resistencia a la insulina (Katakam et al., 2005; Li et al., 2006). Numerosos estudios han relacionado la alteración de esta vía con procesos de estrés oxidativo, y así, por ejemplo, Bashan y colaboradores demostraron que el incremento en la producción de ROS está implicado en alteraciones del

complejo nicotinamida adenina dinucleótido fosfatasa (NADPH), tanto en la subunidad catalítica como en la reguladora (Bashan et al., 2009). En otros estudios se ha observado que la expresión de las subunidades de NADPH oxidasa Nox-1, Nox-2 y Nox-4, se encuentra incrementada en la vasculatura de ratones diabéticos *db/db* resistentes a la insulina (Hwang et al., 2007), y además, los niveles de la subunidad catalítica de NADPH oxidasa, p47phox, también están elevados en células endoteliales de ratones obesos resistentes a la insulina (Furukawa et al., 2004) y en pacientes humanos (Silver et al., 2007).

Una consecuencia fisiopatológica directa de la disminución en la producción de NO bajo condiciones de resistencia a la insulina, es el daño en el reclutamiento microvascular. La disminución en la perfusión capilar, que reduce la superficie disponible para el intercambio de nutrientes, está incuestionablemente involucrada en una menor captación de glucosa en el músculo esquelético (Clark et al., 2003). Cada vez más evidencias apoyan que el transporte transendotelial de insulina es el factor limitante para la captación de glucosa dependiente de la insulina en el músculo (Yang et al., 1989; Miles et al., 1995). Por ello, la disminución en el reclutamiento capilar causada por la resistencia a la insulina podría, no sólo reducir captación de glucosa, también deteriorar el propio transporte de la insulina hacia músculo atravesando el endotelio (Clark, 2008).

La pérdida de la integridad vascular bajo condiciones de resistencia a la insulina podría ser empeorada por anomalías bioquímicas, ya que la reparación vascular por células progenitoras del endotelio (ECP) también se puede encontrar alterada. Por ejemplo, se ha descrito que la menor biodisponibilidad de NO, el incremento de ROS, o las alteraciones en la vía PI3K/Akt, pueden alterar también la movilización de ECPs desde la médula ósea en individuos diabéticos (Tepper et al., 2002) y con Síndrome Metabólico (Fadini et al., 2006). Y los defectos en la migración asociados con la resistencia a la insulina, se pueden atribuir parcialmente a las alteraciones en el citoesqueleto de las ECPs inducidas, a su vez, por la biodisponibilidad disminuida de NO (Segal et al., 2006). La resistencia a la insulina podría también afectar tanto a la supervivencia de las ECPs, como a su capacidad de adhesión, integración endotelial, proliferación y diferenciación (Awad et al., 2005).



## 2.1. Diabetes mellitus

Se considera la diabetes mellitus como un grupo heterogéneo de desórdenes clínicos que comparten como factor común la intolerancia a la glucosa. El término diabetes mellitus se utiliza para describir un síndrome caracterizado por hiperglucemia crónica (niveles de glucosa plasmáticos por encima de 120 mg/dl) y otros desórdenes metabólicos de carbohidratos, lípidos y proteínas. Las dos formas más comunes son la diabetes mellitus tipo 1 y tipo 2.

### a) *Diabetes mellitus tipo 1*

La deficiencia grave de insulina es la manifestación más característica de la diabetes mellitus tipo 1. Es la forma típica de la enfermedad descrita desde hace más de 2000 años, con inicio súbito, hiperglucemia intensa, progresión rápida hacia la cetoacidosis y muerte a menos que reciba tratamiento con insulina. Por lo general se sufre antes de los 21 años de edad y la incidencia es mayor en la pubertad. Los individuos suelen ser delgados y aún después de recibir el tratamiento existe muy poca tendencia a la obesidad. Estas personas no responden a la administración de sulfonilureas y en la necropsia suelen mostrar gran destrucción de las células beta del páncreas. Los estudios realizados en gemelos monocigóticos señalan una tasa de concordancia para diabetes mellitus tipo 1 de tan solo un 50%, por lo que aunque existen factores genéticos evidentes que intervienen en la patogénesis de este tipo diabético, debe haber una importante influencia del medio ambiente. El factor genético tiene relación con la región del complejo de histocompatibilidad mayor leucocitario (HLA-D) del complejo mayor de histocompatibilidad. Las regiones genéticas DQ y DP también se vinculan con la susceptibilidad de padecer esta enfermedad. Como la diabetes mellitus tipo 2 no se relaciona con el HLA, es evidente que estos dos síndromes son genéticamente distintos. La susceptibilidad genética a la diabetes tipo 1 vinculada con el complejo mayor HLA que controla la reacción inmunológica indica que los factores genéticos que participan en la diabetes mellitus tipo 1 confieren mayor sensibilidad a los factores ambientales que proporcionan la destrucción de las células beta del páncreas mediada por el sistema inmunológico. En la diabetes mellitus tipo 1 existe una atrofia pancreática, y pérdida específica de células  $\beta$ , que se caracteriza a menudo por la presencia de macrófagos, linfocitos T y B y otras células del sistema inmunes que reaccionan anómalamente contra esta porción endocrina del páncreas. Existen dos tipos distintos de diabetes mellitus tipo 1: inmune (tipo 1A) y no inmune (tipo 1B). En el primer caso existen factores genéticos y medioambientales que producen la destrucción de las células  $\beta$ -pancreáticas, comúnmente marcadores autoinmunes como anticuerpos. La diabetes mellitus tipo 1 no inmune ocurre de

forma secundaria a otras enfermedades como pancreatitis u otros desórdenes idiopáticos fulminantes (Guyton y Hall, 2006).

b) *Diabetes mellitus tipo 2*

La diabetes mellitus tipo 2 es mucho más común que la tipo 1, y se caracteriza por hiperglucemia en ayuno y gran intolerancia a la glucosa. La incidencia de esta enfermedad es creciente en los Estados Unidos desde 1949. Los factores de riesgo para esta enfermedad son genéticos y medioambientales, e incluyen obesidad, incremento del índice de masa corporal, historial familiar de diabetes tipo 2 o Síndrome Metabólico. La diabetes mellitus tipo 2 tiene un comienzo paulatino, generalmente sin síntomas, lo cual hace difícil establecer el momento de inicio de la alteración a nivel metabólico. La causa es desconocida, no obstante los factores genéticos que influyen en la diabetes mellitas tipo 2 difieren de la tipo 1 dado que no se conoce vínculo alguno con los antígenos HLA ni hay evidencia de autoinmunidad. Afecta principalmente a personas de más de 40 años, la mayoría de los cuales sufren obesidad (Patti, 2004). Como se ha descrito anteriormente, la resistencia a la insulina se define como la disminución a las acciones metabólicas de la insulina por alteración en las vías de señalización (Patti, 2004), desde anormalidades en la molécula de insulina, o elevadas cantidades de antagonistas de la hormona, o regulación a la baja de su receptor, así como disminución de la función de fosforilación del dominio tirosin-cinasa del receptor, o alteración de las proteínas transportadoras de glucosa (GLUT). Se ha propuesto que existen adipocinas asociadas a la resistencia a la insulina, como leptina, adiponectina o resistina. Para compensar estos efectos, se produce una hiperinsulinemia compensadora, que aparece muchos antes que las manifestaciones clínicas de la diabetes. En ocasiones existen individuos niños, adolescentes o adultos jóvenes que sufren diabetes con las mismas características y etiología que la diabetes mellitas tipo 2, aun que por su corta edad la diabetes correspondería a la tipo 1. En este caso se denomina *diabetes de MODY* y el tratamiento es exactamente igual que para la diabetes mellitus tipo 2.

**Tabla I. Principales características de la diabetes mellitus tipo 1 y 2.** (Adaptación: Kathryn et al., 2008).

<b>Terminología</b>	<b>DM tipo 1 (dependiente de insulina)</b>	<b>DM tipo 2 (no dependiente de insulina)</b>
<i>Edad de inicio</i>	< 45 años de edad	> 30 años
<i>Patrón de herencia</i>	Afecta a menos del 10% de los familiares de primer grado	Afectados más del 20% de los familiares de primera grado
<i>HLA</i>	Se relaciona con los sistemas HLA-DR3, DR4, DQB-DQA	Sin relación con el sistema HLA
<i>Inmunidad</i>	Fenómenos autoinmunitarios: Ac contra las células $\beta$ -pancreáticas	No acompaña a fenómenos autoinmunitarios
<i>Peso corporal</i>	Por lo general pacientes delgados	Casi siempre hay obesidad
<i>Metabolismo</i>	Propensión a desarrollar cetoacidosis	Resistencia a la cetoacidosis
<i>Tratamiento</i>	Insulina	Disminución del peso corporal, hipoglucemiantes orales o insulina

### 2.1.1. Complicaciones agudas de la diabetes mellitus

#### 2.1.1.1. *Hipoglucemia*

Los niveles de glucosa descienden por debajo de 60 mg/dl, lo que sucede frecuentemente en individuos con diabetes mellitus tipo 1 tratados con insulina, aunque también con diabetes mellitus tipo 2 en tratamiento con hipoglucemiantes orales. Los síntomas se originan por la activación del sistema nervioso simpático, o por una repentina captación de glucosa abrupta por el cerebro, o por ambos. Los síntomas consisten en reacciones adrenérgicas sufridas durante la disminución de los niveles de glucosa sanguíneos, como taquicardia, palpitaciones, diaforesis, temblores, palidez y ansiedad. Esta respuesta probablemente es generada cuando el hipotálamo detecta bajos niveles de glucosa, y la falta de glucosa en el cerebro produce dolor de cabeza, mareos, irritabilidad, fatiga, pérdida de conocimiento, confusión cambios visuales, hambre, convulsiones y finalmente, coma (Kathryn et al., 2008).

### 2.1.1.2. *Cetoacidosis diabética*

Es una complicación seria de la diabetes mellitus, que comúnmente causa ingresos hospitalarios, e incluso en los casos más graves puede llegar a ser mortal. Se desarrolla cuando existe una deficiencia de insulina y un incremento de hormonas contrareguladoras de la insulina como catecolaminas, cortisol, glucagón y hormonas del crecimiento. Bajo estas condiciones la producción de glucosa hepática incrementa enormemente, disminuye la utilización de glucosa periférica, incrementa la movilización de grasas y así se estimula la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos y la formación de cuerpos cetónicos, que en condiciones normales son utilizados por los tejidos como fuente de energía. La hipercetonemia podría generar que incrementen los niveles de ácidos circulantes, desarrollando acidosis metabólica, que altera el equilibrio electrolítico, disminuyendo los niveles de potasio, lo que provoca hiperventilación con el fin de compensar la cetoacidosis (respiración de Kussmaul), mareo, depresión del sistema nervioso central, cetonuria, anorexia, náuseas, dolor abdominal, sed y poliuria.

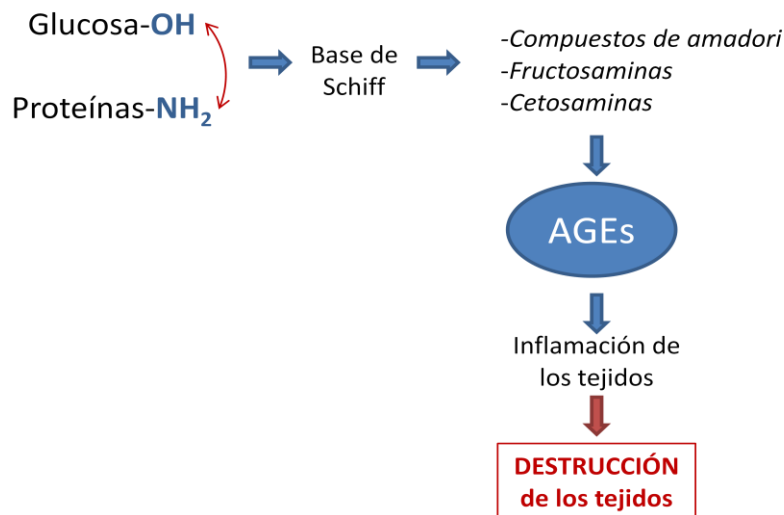
### 2.1.1.3. *Síndrome hiperglucémico hiperosmolar no cetónico*

Se diferencia de la cetoacidosis diabética en que la deficiencia de insulina no es tan severa como en el caso anterior y los niveles de ácidos grasos libres también son menores, además de que no existe cetosis. Los niveles de insulina son suficientes para prevenir la lipólisis, aunque no para un uso apropiado de la glucosa, por lo que en este caso se produce una elevación extrema en los niveles de glucosa plasmáticos, lo que incrementa la osmolaridad plasmática, produciendo síntomas neurológicos como estupor (Guyton y Hall, 2006; Ganz y Ganz, 2001).

## 2.1.2. Complicaciones crónicas de la diabetes mellitus

Los niveles elevados de glucosa a largo plazo pueden producir serias complicaciones microvasculares, como retinopatías y nefropatías; o enfermedad macrovascular, como la enfermedad arterial coronaria, accidentes cerebrovasculares o enfermedad vascular periférica. Cuando se mantienen niveles elevados de glucosa en sangre durante mucho tiempo, los grupos alcohol de la glucosa se unen con los grupos  $\text{NH}_2$  de las proteínas formando las llamadas “bases de Schiff”, las cuales sufren reordenaciones hacia compuestos de Amadori

(también denominados fructosaminas o cetoaminas). Éstos últimos a su vez pueden unirse con otras proteínas generando los “productos de glucosilación avanzada” (AGEs), en los cuales la estructura original de la proteína que los forma queda deformada y pierde su funcionalidad, provocando la inflamación del tejido del que forma parte, y finalmente su destrucción.



**Figura VIII. Formación de compuestos avanzados de glucosilación (AGEs).** La glucosa se une a las proteínas, alterando su estructura, lo que explica todas las complicaciones crónicas de la diabetes mellitus coma (Adaptación de: Kathryn et al., 2008).

#### 2.1.2.1. Hiperglucemia y glucosilación no enzimática

Los AGEs formados por la unión de la glucosa a las proteínas pueden dañar los tejidos o producir condiciones patológicas durante la diabetes (Vlassara y Palace, 2002; Jerums et al., 2003; Li et al., 2004):

- Se unen y capturan proteínas como la albúmina, lipoproteínas de baja densidad (LDL), inmunoglobulinas y otras proteínas del sistema inmune, engrosando la membrana basal o incrementando la permeabilidad de los vasos sanguíneos y de los nervios.
- Unión a receptores en macrófagos y células mesangiales glomerulares, estimulando la liberación de citocinas y factores de crecimiento que estimulan la proliferación celular en los glomérulos, en el músculo liso de los vasos sanguíneos y en la síntesis de colágeno, produciendo fibrosis.
- Inducen la oxidación lipídica y el estrés oxidativo.
- Inactivan el NO, lo que provoca la pérdida de vasodilatación, y disfunción endotelial.
- Producen cambios procoagulantes sobre las células endoteliales promoviendo la adhesión plaquetaria y disminuyendo la fibrinólisis.

#### 2.1.2.2. *Hiperglucemia y la vía de los polioles*

Los tejidos que no requieren insulina para el transporte de glucosa, como el riñón, las células de la serie roja, los vasos sanguíneos, el cristalino y los nervios, utilizan una vía metabólica alternativa para metabolizar la glucosa conocida como la vía de los polioles. En condiciones de hiperglucemia, la glucosa es derivada a esta vía y convertida a sorbitol por la enzima aldosa-reductasa, el cual es lentamente transformado a fructosa por la acción de la sorbitol-deshidrogenasa. La acumulación de sorbitol y fructosa incrementa la presión osmótica intracelular por captación de agua, produciendo daño celular. Esto es particularmente evidente en el cristalino del ojo y provoca hinchazón con alteraciones visuales y cataratas. En los nervios, el sorbitol interfiere con el ión plomo dañando las células de Schwann, lo que deteriora la conducción nerviosa. Las células de la serie roja se hinchan y vuelven rígidas interfiriendo con la perfusión vascular (Guyton y Hall, 2006; Ganz y Ganz, 2001).

#### 2.1.2.3. *Proteína cinasa C (PKC)*

Esta enzima es activada de forma inadecuada durante la hiperglucemia, lo que conlleva diferentes consecuencias como resistencia a la insulina, producción de citocinas y matriz extracelular, proliferación de las células vasculares, incremento de la contractilidad e incremento de la permeabilidad (Schmitz-Peiffer y Biden, 2008). Estos efectos contribuyen a las complicaciones microvasculares, macrovasculares y neurológicas de la diabetes.

#### 2.1.2.4. *Enfermedad microvascular*

Las complicaciones microvasculares diabéticas son la causa de la ceguera, fallo renal y varias neuropatías (Colucciello, 2004). El engrosamiento de la membrana capilar, hiperplasia de las células endoteliales, trombosis y degeneración pericítica características de la microangiopatía diabética y suceden en periodos de 1 a 2 años. El engrosamiento eventual de la pared de los capilares produce la disminución en la perfusión de los tejidos. La hiperglucemia es un requisito previo a los cambios microvasculares, debido a la glucación de proteínas estructurales, y acumulación de AGEs. La frecuencia con la que aparecen las lesiones es proporcional a la duración de la enfermedad y a los niveles de glucosa plasmáticos.

*Retinopatías:* La retina es el tejido con mayor actividad metabólica por peso de tejido en el cuerpo. Por ello, es una diana muy vulnerable para la enfermedad microvascular en la diabetes mellitus. La retinopatía diabética es una respuesta a la isquemia de la retina que se produce como resultado de cambios en los vasos sanguíneos y agregación de glóbulos rojos. Además, la hipertensión descontrolada es un factor de riesgo que empeora la retinopatía. La prevalencia y severidad de la retinopatía está estrechamente ligada a la edad del individuo y duración del control hiperglucémico. Podría aparecer en el individuo a la vez que el diagnóstico de la diabetes mellitus tipo 2 como resultado de una larga latencia preclínica de esta forma de diabetes. La mayor parte de individuos con diabetes sufren algún tipo de retinopatía (Grassi, 2003), que a su vez se asocia a la nefropatía diabética, por lo que se conoce como síndrome renal-retiniano.

*Nefropatía diabética:* La diabetes es la causa principal de fallo renal, y aproximadamente el 30 % de los individuos con diabetes mellitus tipo 1 y el 40 % con diabetes tipo 2, desarrollan algún tipo de nefropatía (Lewis y Lewis, 2003). Las primeras fases de la nefropatía son asintomáticas, y comienzan a desarrollarse 10 años más tarde en la diabetes tipo 1, y entre 5 y 8 años más tarde en la tipo 2. Aunque los mecanismos exactos por los cuales la diabetes produce nefropatía no se conocen completamente, se están investigando mecanismos como hiperglucemia, hiperfiltración, aumento de la viscosidad sanguínea, incremento de la presión glomerular, albumina, PKC, factores de crecimiento, AGEs, estrés oxidativo o hipercolesterolemia (Harris et al., 1991; Odoni y Ritz, 1999; Hsu et al., 2000; Prabhakar, 2004). El glomérulo renal se ve dañado por la desnaturalización de proteínas debido a los elevados niveles de glucosa y sus efectos adversos de hipertensión intraglomerular. Las modificaciones en el glomérulo renal pueden suceder de forma temprana en la diabetes mellitus y ocasionalmente precede a las manifestaciones de la enfermedad. El engrosamiento de la membrana glomerular provoca glomerulosclerosis intercapilar difusa, lo que se desarrolla durante los primeros años de la diabetes. La microalbuminuria es la primera manifestación de disfunción renal, y la proteinuria continua no tratada, generalmente anuncia una expectativa de vida de 10 años menos. La micoralbuminuria es también un factor de riesgo independiente para la enfermedad cardiovascular (Battisti et al., 2003). Las fugas de albúmina durante su filtración glomerular pueden ser debidas al incremento en el tamaño del poro de la membrana. Antes del desarrollo de proteinuria, no existen signos clínicos de la glomerulosclerosis progresiva, después de la proteinuria, se produce edema generalizado en todo el cuerpo e hipertensión (Steffes y Mauer, 1991).

#### 2.1.2.5. *Enfermedad macrovascular*

Es la principal causa de morbilidad y mortalidad en individuos con diabetes mellitus tipo 2. Los factores que contribuyen a la aterosclerosis prematura durante la diabetes son muchos, como hiperinsulinemia, hiperglucemia, disminución de lipoproteínas de alta densidad (HDL), oxidación de lipoproteínas, alteraciones vasculares inducidas por los AGEs, y disfunción endotelial. Las placas fibrosas de aterosclerosis son resultado de la proliferación del músculo liso subendotelial en la pared arterial y del desarrollo de depósitos en los vasos. Durante la diabetes mellitus son frecuentes la elevación de triglicéridos y los bajos niveles de HDL protectoras, así como la elevación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), y su oxidación. Además, la hipertensión puede incrementar la presión de la pared vascular, disminuir la síntesis de NO, y favorecer la pérdida de la regulación del flujo sanguíneo (Sowers, 2004; Winer y Sowers, 2003).

*Enfermedad arterial coronaria:* El riesgo de enfermedad arterial coronaria en individuos con diabetes mellitus tipo 2 es más elevado que en resto de la población. Es la causa más común de muerte en pacientes con diabetes mellitus tipo 2. El infarto de miocardio consiste en la necrosis en una zona del músculo cardíaco por oclusión de las arterias coronarias que lo riegan, y es la causa del 20 % de las muertes de individuos diabéticos. Además, la incidencia del fallo cardíaco congestivo es mayor en individuos diabéticos (Schoenhagen y Nissen, 2004).

*Accidentes cerebrovasculares:* La población diabética sufre el doble de isquemias cerebrovasculares que la población no diabética. La hipertensión y las dislipemias son factores de riesgo de gran importancia para estos eventos, y su control los disminuye enormemente (Bell, 1994).

*Enfermedad arterial periférica:* Se ha documentado bien el incremento de incidencias de gangrena y amputación en personas diabéticas, particularmente en la diabetes tipo 2 (Al-Delaimy et al., 2004), por la obstrucción de pequeñas arterias y arteriolas de los miembros periféricos, principalmente de las extremidades inferiores, concretamente en los pies y los dedos de los pies. La erección peneana, cuyo mecanismo es puramente vascular, también se ha visto afectada en estados diabéticos como una de las primeras complicaciones microvasculares, principalmente por alteraciones en la vasodilatación mediada por NO (Ganz y Seftel, 2000; Jesmin et al 2003; Nangle et al., 2003; Musicki et al., 2005).



#### 2.1.2.6. Neuropatías diabéticas

La diabetes es la principal causa de neuropatías en el mundo desarrollado, siendo la causa de múltiples factores metabólicos, genéticos y ambientales. En el estado subclínico de la neuropatía existen evidencias de la disfunción de los nervios periféricos como son la conducción motora y sensorial más lenta, aunque sin síntomas clínicos. En el estado clínico, los síntomas de deficiencia nerviosa son detectables y están presentes. En la neuropatía las porciones distales de las neuronas son las primeras afectadas. Los primeros cambios morfológicos tanto en los nervios periféricos como centrales, incluyen la degeneración axonal por desmielinización de las fibras nerviosas debido a la alteración en las células de Schwann, cuya actividad metabólica se ve alterada, provocando así la pérdida del recubrimiento de mielina. Así, la velocidad de la conducción nerviosa motora y la percepción sensorial se ven alteradas durante la diabetes (Guyton y Hall, 2006; Ganz y Ganz, 2001).

### 2.2. Resistencia a la insulina y disfunción endotelial

El endotelio es el primer tejido con el que se encuentran las moléculas liberadas en el sistema vascular. Sin embargo, esta posición privilegiada expone a las células endoteliales a las consecuencias de alteraciones en la concentración y/o composición de factores circulantes, que pueden estimular anormalmente a las células endoteliales, alterando la función endotelial normal. En condiciones fisiológicas, el daño producido en las células endoteliales por la exposición a factores de riesgo, es mitigado por un proceso reparador endógeno, por las células progenitoras endoteliales provenientes de la médula ósea (Asahara et al., 1997). La disminución de la disponibilidad y/o movilización de ECPs produce un desequilibrio entre el daño endotelial y la capacidad para reparar el endotelio, suceso que acelera el comienzo de la disfunción endotelial. Un endotelio disfuncional tiende hacia un estado vasoconstrictor, protrombótico y proinflamatorio, secundario a la pérdida de actividad del NO (Gimbrone, 1995). La pérdida de bioactividad de NO, a su vez, puede ser causa de la disminución en la expresión y/o función de la eNOS (Wilcox et al., 1997), carencia en los sustratos o cofactores de la eNOS (Cosentino et al., 1998; Creager et al., 1985), o incremento en la liberación de mediadores endoteliales con efectos vasculares opuestos (Marasciulo et al., 2006; Mather et al., 2004).

Los mecanismos moleculares por los cuales la resistencia a la insulina, la hiperinsulinemia, los elevados niveles de glucosa, la hipertrigliceridemia y la inflamación inducen disfunción endotelial, están interconectados y solapados, por lo que resulta complicado separarlos (Musicki y Burnett, 2007). Sin embargo, el papel que juega la insulina en la regulación fisiológica de la homeostasis vascular, podría explicar como la resistencia a la insulina y la hiperinsulinemia prolongada contribuyen directamente a la disfunción endotelial, además de producir glucotoxicidad y lipotoxicidad. Es lógico pensar, que uno de los mecanismos por los cuales la resistencia a la insulina produce disfunción endotelial, es porque una menor activación de eNOS a través de la vía de PI3K, produce la disminución en la biodisponibilidad de NO. Sin embargo, también se produce el incremento en la actividad de la vía dependiente de MAPK produciendo la liberación de mediadores que se oponen a la acción del NO, y este hecho podría explicar cómo la hiperglucemia induce una pérdida relativa de la bioactividad de NO, favoreciendo la disfunción endotelial. El hecho de que la resistencia a la insulina y la hiperinsulinemia actúen de forma conjunta, hace que sus consecuencias sobre la función endotelial sean más severas que la suma de cada una de ellas por separado (Potenza et al., 2009).

### 2.2.1. Hiperinsulinemia

La hiperinsulinemia afecta a la función endotelial tanto directa como indirectamente. Estudios en animales demuestran que ratas tratadas con insulina de forma crónica tienen incrementados los niveles de fosforilación sobre la Serina de IRS1/2 y del receptor de insulina, lo que se asocia con la inactivación de la vía PI3K/Akt (Ueno et al., 2005). Además, la exposición crónica a elevados niveles de insulina podría inducir resistencia a la insulina, que a su vez deteriora la vía dependiente de la PI3K y reduce la producción del NO en respuesta a la insulina. Sin embargo, la hiperinsulinemia es normalmente una consecuencia de la resistencia metabólica a la insulina, y no la causa, ya que se desarrolla como mecanismo compensador para mantener la normoglucemia. Una característica importante de la resistencia a la insulina es el deterioro selectivo de la vía dependiente de PI3K, mientras que la vía dependiente de MAPK permanece inalterada, lo que provoca un desequilibrio entre las acciones vasculares de ambas vías de señalización activadas por la insulina.

Estudios en células endoteliales *in vitro*, demuestran que niveles elevados de insulina incrementan la expresión de moléculas de adhesión como VCAM-1 y E-selectina por la vía de

MAPK, lo que facilita la interacción de monocitos y favorece procesos pro-aterogénicos (Montagnani et al., 2002a). El incremento de la vía dependiente de MAPK activada por insulina, no sólo aumenta la expresión del gen de ET-1 y la liberación de ET-1, sino que también incrementa la expresión del receptor ET<sub>A</sub> y la proliferación de células musculares lisas en cultivos celulares (Frank et al., 1993). En animales y en humanos la hiperinsulinemia incrementa la secreción de ET-1 del endotelio incrementando su actividad. Todo esto favorece el tono vasoconstrictor que contribuye a una función vascular anormal y al incremento de la presión sanguínea sistémica (Piatti et al., 1996; Cardillo et al., 1999; Potenza et al., 2005). Además, el incremento en la estimulación de la vía de MAPK está implicado en las alteraciones de la integridad endotelial y en la pérdida de permeabilidad vascular y microvascular subyacente en retinopatías (Miyamoto et al., 2007) y microalbuminuria (Satchell et al., 2008).

Curiosamente, niveles elevados de insulina pueden deteriorar la función endotelial incluso en ausencia de resistencia a la insulina. Así, a concentraciones patológicas, la insulina ejerce efectos proinflamatorios y proaterogénicos sobre las células endoteliales porque incrementa la expresión de VCAM-1, y la interacción entre los monocitos y el endotelio, mediante la activación de la vía p38-MAPK (Madonna et al., 2004, 2007; Madonna y Caterina, 2009). Este incremento de la vía p38-MAPK debido a los niveles elevados de citoquinas proinflamatorias podría además inhibir la proliferación y diferenciación de ECPs in vitro (Cubbon et al., 2007).

También se ha descrito que niveles elevados de insulina favorecen que las células endoteliales expresen más receptores para IGF-I que receptores para insulina (Chisalita y Arnqvist, 2004; Li et al., 2005). Además de las concentraciones de la hormona observadas durante estados de resistencia a la insulina, la insulina activa potentemente ambos receptores en las células endoteliales, tanto los de insulina como los de IGF-I (Li et al., 2005). Por todo ello, debido a que la vía dependiente de MAPK permanece inalterada, la hiperinsulinemia podría activar ambos tipos de receptores, incrementando la expresión de moléculas de adhesión, contribuyendo así a la disfunción endotelial y a la aterosclerosis (Li et al., 2009).

Además, se ha observado una disminución progresiva en la vasodilatación dependiente del endotelio, tanto en arterias femorales como braquiales de sujetos sanos expuestos a modestos pero prolongados niveles de insulina, y también que la infusión simultánea de vitamina C, revierte dicha disfunción endotelial. Esto sugiere que, al menos en arterias grandes, la hiperinsulinemia puede afectar a la vasodilatación mediada por el endotelio por el

incremento de estrés oxidativo (Arcaro et al., 2002). De acuerdo con estos hallazgos, el incremento en la producción de  $O_2^-$  intracelular dependiente de la dosis y del tiempo, se puede detectar tras 1 hora de exposición de las células endoteliales a la insulina (Potenza et al., 2009).

Por todo ello, el incremento de las concentraciones de insulina durante los estadios de resistencia a insulina, podría tener consecuencias directas sobre la función endotelial alterando los mecanismos involucrados en el mantenimiento de la biodisponibilidad de NO.

### 2.2.2. Glucotoxicidad

La hiperglucemia asociada a la diabetes es una causa importante de la resistencia a la insulina por aumentar el estrés oxidativo, la formación de compuestos de glucosilación avanzada (AGEs) y estimular la vía de biosíntesis de hexosaminas.

*Estrés oxidativo:* Estados prolongados de hiperglucemia incrementan la producción de ROS, los cuales dañan gravemente la translocación del transportador de glucosa GLUT-4 hacia la superficie celular para estimular la captación de glucosa (Rudich et al., 1998), y existen estudios que demuestran la mejora de esta situación por el tratamiento con antioxidantes (Maddux et al., 2001; Haber et al., 2003). El tratamiento de células con desacopladores de la fosforilación oxidativa mitocondrial inhiben la producción de ROS en respuesta a la hiperglucemia, además previene la activación de la proteína cinasa C inducida por la glucosa, encargada de la formación de AGEs, acumulación de sorbitol y activación del factor nuclear (NF)- $\kappa$ B (Nishikawa et al., 2000). Los antioxidantes además protegen contra los efectos de ROS sobre el transporte de la glucosa in vivo e in vitro (Rudich et al., 1998; Maddux et al., 2001; Haber et al., 2003). El incremento del estrés oxidativo se asocia a la estimulación de algunas cinasas y a la activación de factores de transcripción que provocan resistencia a la insulina, como NF- $\kappa$ B. A su vez, la activación de serin/treonin cinasas como JNK, PKCs y el complejo I $\kappa$ B cinasa  $\beta$  (IKK $\beta$ ) fosforilan a IRS-1 de tal forma que se daña su capacidad para activar la PI3K, lo que inactiva la vía, resultando en la disminución de la translocación del GLUT-4 y de la producción de NO activada por la insulina (Gao et al., 2002b; Hirosumi et al., 2002; Furukawa et al., 2004). Además los ROS activan señales proinflamatorias favoreciendo la transcripción de IL-6, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  (Kamata et al., 2005). La hiperglucemia induce la expresión de proteínas procoagulantes y de matriz extracelular, incrementa a la apoptosis de células endoteliales,

disminuye su proliferación, e inhibe la fibrinólisis, originando en disfunción endotelial (Brownlee, 2005). Los aniones superóxido secuestran el NO y producen peroxinitrito, el cual reduce la disponibilidad de NO, alterando la vasodilatación (Salt et al., 2003). Además, los ROS activan las PKCs provocando alteraciones en la expresión de eNOS, ET-1, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), incrementando la expresión de genes proinflamatorios (Brownlee, 2005). La hiperglucemia induce apoptosis de las células endoteliales e incrementa la expresión de moléculas de adhesión intracelular (ICAM), VCAM y E-selectina, así como la producción de IL-6, a través de la producción de ROS y activación de las PKCs (Esposito et al., 2002; Quagliaro et al., 2005).

*Productos avanzados de glucosilación (AGEs):* La formación de AGEs se encuentra estimulada en estados de hiperglucemia y estrés oxidativo (Nishikawa et al., 2000), y estos productos de glucosilación, a su vez, inhiben la fosforilación de IRS-1 e IRS-2 estimulada por la insulina, produciendo así un deterioro de la vía de señalización dependiente de PI3K y Akt, disminuyendo también la actividad de la glucógeno sintasa en líneas celulares de músculo esquelético (Miele et al., 2003). Además, los AGEs producen ROS incrementando el estrés oxidativo por la activación de la NADPH oxidasa a través de receptores específicos para AGEs (RAGEs) (Wautier et al., 2001), que estimulan señales proinflamatorias activando NF- $\kappa$ B (Hofmann et al., 1999). La interacción de los AGEs con las proteínas endoteliales también provoca disfunción endotelial (Wendt et al., 2006), ya que se modifican las proteínas de la matriz extracelular como el colágeno y la laminina, disminuyendo la elasticidad e incrementando la filtración de fluidos (Huijberts et al., 1993). En esta situación se favorece la infiltración de macrófagos que se convierten en células espumosas que incrementan la inflamación vascular y promueven la arterosclerosis. (Chavakis et al., 2004).

*Vía de biosíntesis de hexosaminas:* El aumento de la biosíntesis de hexosaminas también ha sido uno de los mecanismos propuestos a través de los cuales la hiperglucemia desarrolla resistencia a la insulina (Buse, 2006), ya que estimula la O-gluco-N-acilación de diferentes sustratos como el IRS-1, disminuyendo su actividad, lo que reduce la traslocación de GLUT-4 (Baron et al., 1995; Ball et al., 2006). La glutamina (fructosa-6- fosfato aminotransferasa, GFAT) es una enzima limitante de esta vía, cuyo producto final es la uridina 5'-difosfato (UDP), el cual a su vez es un producto de la O-gluco-N-acil transferasa, que media la modificación de proteínas. La sobreexpresión de GFAT en ratones transgénicos provoca resistencia a la insulina (Veerababu et al., 2000). Esta vía podría funcionar como un sensor de nutrientes jugando un papel esencial en la resistencia a la insulina y las complicaciones

vasculares por inducir la O-gluco-N-acilación de las proteínas implicadas en la vía de señalización activada por la insulina (Rossetti, 2000), como sucede con el IRS-1 y Akt alterando la translocación de GLUT-4, captación de glucosa y síntesis de NO (Baron et al., 1995; Du et al., 2001, Ball et al., 2006). Además, en las células endoteliales, la hiperglucemia incrementa la actividad de esta vía que media, a su vez la expresión de TGF- $\beta$  y PAI-1, que producen complicaciones vasculares (Duet al., 2000; Brownlee, 2005).

### 2.2.3. Lipotoxicidad

En estados de *resistencia a insulina* se han observado niveles elevados de ácidos grasos libres (AGL). La resistencia a la insulina en los adipocitos conduce a una actividad incrementada de la lipasa sensible a la hormona y una mayor hidrólisis y liberación de AGL, que contribuyen a la resistencia metabólica a la insulina, lo que ha sido demostrado que estadíos de diabetes, obesidad o dislipidemias (Shulman, 2000). Se ha observado que la infusión de AGL en humanos deteriora la captación de glucosa estimulada por la insulina, así como la vasodilatación dependiente de NO (Steinberg y Baron, 2002). La exposición de los vasos sanguíneos, el miocardio y el músculo esquelético a niveles altos de AGL inicia múltiples procesos celulares que incluyen señalización alterada de la insulina (Wang et al., 2006), estrés oxidativo (Du et al., 2006), alteraciones en el sistema local renina angiotensina (RAS) (Watanabe et al., 2005) e incremento de la sensibilidad adrenérgica del músculo liso (Stepniakowski et al., 1996), contribuyendo así a la resistencia a la insulina cardiaca, vascular y metabólica.

*Estrés oxidativo:* De forma similar a la hiperglucemia, niveles altos de AGL inducen estrés oxidativo y señales proinflamatorias. Algunos metabolitos de los AGL como el acetil Coenzima A (CoA) y el diacilglicerol (DAG) estimulan la actividad de serina-cinasas como la PKC que promueven la resistencia a insulina fosforilando directamente el IRS-1 en un lugar diferente al que lo hace la insulina, dañando así, toda la cascada de señalización dependiente de PI3K y Akt (Lowell y Shulman, 2005; Li et al., 2004c). Estudios recientes en humanos, donde se utiliza resonancia magnética espectroscópica, han revelado que el incremento de AGL inhibe directamente el transporte de glucosa por inducir disfunción mitocondrial (Lowell y Shulman, 2005; Savage et al., 2005), y el incremento de los niveles de lípidos intracelulares se asocia a una menor oxidación mitocondrial en pacientes con resistencia a la insulina (Petersen et al., 2003, 2004). A su vez, la disfunción mitocondrial observada, desacopla la fosforilación oxidativa, provocando un incremento en la producción de ROS. Además, el aumento de la

actividad NADPH asociado a la obesidad genera un desequilibrio en la producción de adipoquinas, incluyendo adiponectina, PAI-1, IL-6, y proteína quimioattractora de monocitos (MCP)-1, disminuyendo así la expresión de enzimas detoxificantes. Por ello la lipotoxicidad podría aumentar el estrés oxidativo en el tejido adiposo, provocando una secreción errónea de adipoquinas, lo que deteriora el metabolismo de la glucosa en el músculo esquelético (Furukawa et al., 2004). La infusión de lípidos incrementa la producción de ROS y la inflamación, deteriorando la vasodilatación de la arteria braquial en humanos (Tripathy et al., 2003). Los AGL estimulan además la NADPH oxidasa para producir ROS a través de mecanismos dependientes de PKC en las células endoteliales (Inoguchi et al., 2000).

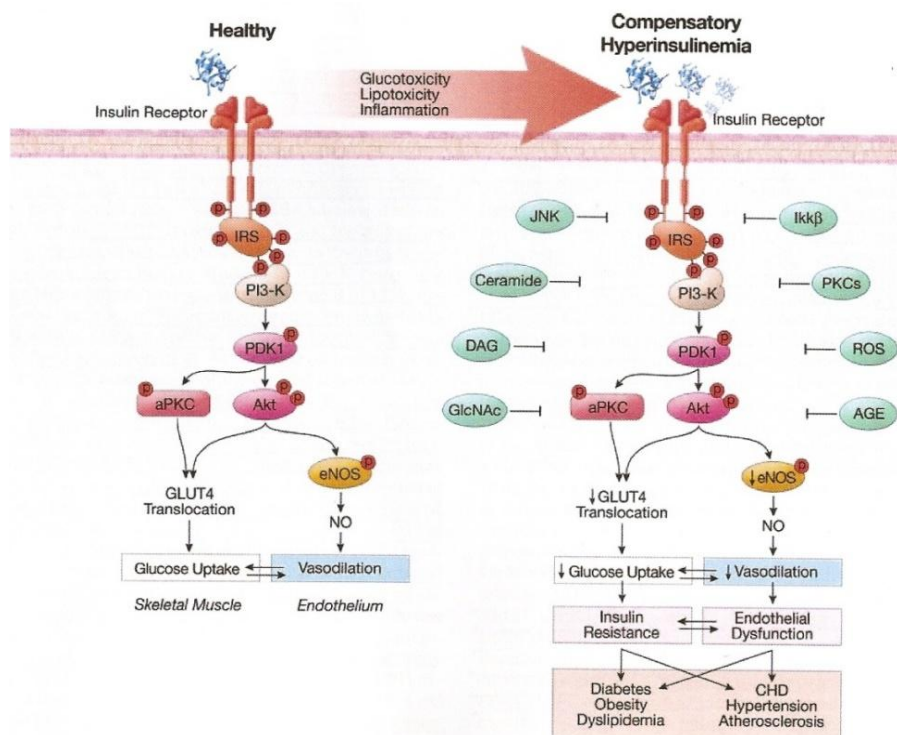
*Señales proinflamatorias:* Por otra parte, los AGL, también activan vías de señalización proinflamatorias, lo que contribuye a la resistencia a insulina. El aumento de ROS y de la actividad de la PKC en respuesta a los elevados niveles de AGL activa el NF- $\kappa$ B, un factor de transcripción asociado con la inflamación que a su vez activa la producción de otras citoquinas proinflamatorias, incluidas el TNF- $\alpha$  y la IL-6 (Ajuwon et al., 2005; Jové et al., 2005; Boden et al., 2005). El TNF- $\alpha$  activa la producción de IKK $\beta$  y JNK, citoquinas inflamatorias que juegan un papel primordial en la relación existente entre las vías de señalización inflamatorias y la vía de señalización insulínica, generando resistencia a insulina mediante la fosforilación de IRS-1/2 (Hirosumi et al., 2002).

*Ceramidas:* La ceramida es un producto derivado de los ácidos grasos saturados de cadena larga, que inhibe la activación de Akt estimulada por la insulina y la translocación de GLUT-4 (Chavez et al., 2003). En contraste, otros estudios demuestran que la ceramida es capaz activar la eNOS e incrementar la producción de NO (Igarashi et al., 1999). Sin embargo, produce un exceso de ROS que secuestran al NO para producir peroxinitrito (Li et al., 2002a).

#### 2.2.4. Inflamación

Tanto la diabetes, como obesidad y otros desórdenes metabólicos están asociados con estados proinflamatorios caracterizados por un aumento de los marcadores de la inflamación circulantes, en particular, proteína reactiva C (CRP), que ha sido identificada como un factor de riesgo de desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 (Pradhan et al., 2001). Las dislipemias, la enfermedad arterial coronaria y la aterosclerosis son desórdenes cardiovasculares con disfunción endotelial que se asocia al incremento en los niveles circulantes de marcadores

inflamatorios (Berg y Scherer, 2005). Existen numerosos mecanismos de señales proinflamatorias implicadas en el desarrollo de resistencia a insulina, entre ellas TNF- $\alpha$ , que probablemente sea el que se ha estudiado más ampliamente. Esta citoquina proinflamatoria activa gran variedad de serin-cinasas como JNK, IKK $\beta$  e IL-1, que directa o indirectamente, aumentan la fosforilación de la serina<sup>24</sup> de IRS-1/2 produciendo la disminución en la actividad de la vía PI3K/Akt (de Alvaro et al., 2004; Kim et al., 2005; Nguyen et al., 2005). También se ha demostrado que estas citocinas proinflamatorias inhiben la activación de la eNOS inducida por la insulina (Kim et al., 2001), así como su expresión (Anderson et al., 2004). El NF- $\kappa$ B también estimula la expresión de moléculas de adhesión como ICAM, VCAM y E-selectina, que contribuyen también a la disfunción endotelial de los vasos (Min et al., 2005). El NO, tiene además acciones anti-inflamatorias en el endotelio, inhibiendo la actividad de NF- $\kappa$ B (Peng et al., 1995) y reduciendo la expresión de moléculas de adhesión leucocitarias como VCAM, ICAM y E-Selectina (De Caterina et al., 1995). Por ello, la reducción en la biodisponibilidad de NO bajo condiciones basales, provoca la resistencia a la insulina y podría ser un factor patogénico adicional en las enfermedades crónicas como aterosclerosis, hipertensión o diabetes, donde destaca la presencia de componentes pro-inflamatorios. El TNF- $\alpha$  estimula, además, la expresión de otras proteínas inflamatorias como la CRP y la IL-6, correlacionadas con el riesgo de enfermedad cardiovascular (Saito et al., 2003; Jialal et al., 2004).



**Figura IX.** La Resistencia a la Insulina viene determinada por procesos de hiperinsulinemia, glucotoxicidad, lipotoxicidad e inflamación, que generan un deterioro de la vía dependiente de la PI3K, con la consecuente disfunción endotelial. (Muniyappa et al., 2007).



Todos estos mecanismos contribuyen al deterioro de la vía IRS/PI3K/Akt, encargada de las acciones tanto metabólicas, como vasodilatadoras de la hormona, por lo que glucotoxicidad, lipotoxicidad, mecanismos proinflamatorios y estrés oxidativo favorecen el desarrollo de estados de resistencia a la insulina, al impedir la translocación de transportador GLUT-4 hacia la bicapa lipídica de la célula para la captación de glucosa, así como de disfunción endotelial, impidiendo la posterior fosforilación de la eNOS, y en última instancia, su activación dependiente de insulina. Numerosos estudios demuestran que la resistencia a la insulina y el Síndrome Metabólico incrementan el riesgo de enfermedad cardiovascular. La disfunción endotelial es un evento clave en las complicaciones vasculares por desórdenes metabólicos, incluyendo diabetes, obesidad y Síndrome Metabólico. La resistencia a la insulina y la hiperglucemia alteran la función endotelial causando un desequilibrio en la liberación de mediadores endoteliales con efectos vasculares opuestos sobre la función vascular. Así, la pérdida o disminución en la biodisponibilidad de NO endotelial, el incremento en la producción de ROS o un incremento en la liberación de ET-1, son factores que intervienen alterando las vías de señalización de la insulina. Es esencial entender la contribución de la resistencia a la insulina e hiperinsulinemia a la fisiopatología de la disfunción endotelial, para desarrollar nuevas dianas terapéuticas como tratamiento y prevención de complicaciones cardiovasculares en estados diabéticos, de obesidad y Síndrome Metabólico (Muniyappa et al., 2007).

### 3. RESISTENCIA A LA INSULINA Y ENFERMEDAD ARTERIAL CORONARIA

Las enfermedades cardiovasculares son actualmente la principal causa de muerte en España, representando el 37 % de las defunciones registradas por el Instituto Nacional de Estadística (INE) durante el año 2007. Asimismo, dentro de estas enfermedades cardiovasculares, la cardiopatía isquémica, también conocida como insuficiencia coronaria, isquemia de miocardio o enfermedad arterial coronaria, es la patología más frecuente, responsable de aproximadamente un 30 % de las víctimas por accidente cardiovascular. De acuerdo con el centro Nacional de Estadísticas (EEUU), y la *American Heart Association* (AHA, Asociación norteamericana de cardiología), las enfermedades cardiovasculares afectan aproximadamente a un 60% de la población de más de 65 años en los países desarrollados, y concretamente las coronariopatías provocaron más de una de cada 5 muertes en 2000, siendo la primera causa de muerte en los Estados Unidos. De las 681.000 muertes que se produjeron ese año el 50.6 %, correspondió a los hombres y el 49.4% a las mujeres. La AHA afirmó que si se eliminaban las enfermedades cardiovasculares, la expectativa de vida podría aumentar casi 7 años. Para 2020 se prevee que la enfermedad cardiovascular será la causa más común de muerte en todo el mundo por primera vez en la historia de la humanidad (Hoyert et al., 1999).

El término coronariopatía describe la enfermedad cardíaca causada por la alteración del flujo sanguíneo coronario. En la mayoría de los casos, las coronariopatías se asocian con aterosclerosis, y causan angina, infarto de miocardio, arritmias cardíacas, defectos de la conducción, insuficiencia cardíaca y muerte súbita. El infarto de miocardio es la causa principal de muerte en los hombres y en las mujeres norteamericanos, y es responsable de más de 218.000 muertes por año (AHA, 2003). Durante los últimos años se han producido grandes avances en la comprensión de la patogenia de las coronariopatías y en el desarrollo de técnicas diagnósticas y tratamientos para la enfermedad. No obstante, la disminución de la tasa de morbilidad-mortalidad no refleja estos avances científicos, probablemente debido a que muchas de las evoluciones dependen más de factores relacionados con el estilo de vida y la edad que con progresos de la ciencia.

La aterosclerosis es una enfermedad metabólica cuyo órgano diana es la pared arterial. El ataque vascular obstructivo evoluciona progresiva y silenciosamente debutando de forma súbita, grave y mortal con el infarto del miocardio. La aterosclerosis ataca al hombre cuando es más útil, a él mismo, a su familia y a la sociedad (Bonow et al., 2004). En 1956, Virchow indicó que la aterosclerosis se producía como resultado de los fenómenos hemodinámicos del flujo

sanguíneo, la sangre y sus componentes y los elementos constituyentes de la pared arterial. Estos criterios han sido reforzados, interpretándose como una respuesta defensiva del tejido conectivo de la pared arterial ante una agresión permanente y exponencial, manifestándose la proliferación fibroblástica y la respuesta inflamatoria (Gibbons, 2000).

Los síndromes de cardiopatía isquémica son manifestaciones tardías de una aterosclerosis coronaria, que probablemente comienza desde la infancia y su transformación es acelerada en individuos hipertensos, diabéticos, fumadores y obesos (Vogel, 1997). La progresión de la placa, con la hemorragia intraplaca, trombosis, disrupción y ruptura pone de manifiesto la asociación entre las lesiones y los consecuentes daños en los órganos dependientes, la cual está dada por la proliferación de la matriz de tejido conectivo o capa fibrosa que aísla el núcleo lipídico de la circulación general y la acumulación de lípidos que gradualmente crecen hacia la luz vascular, obstruyendo la misma y posibilitando el desarrollo de sus complicaciones, como la hemorragia intraplaca y la trombosis. La disrupción de la placa y la ruptura inician los mecanismos que llevan a la formación del trombo, los cuales dependiendo de su magnitud serán responsables de diferentes cuadros clínicos, jugando un papel importante en la oclusión arterial y en el Síndrome coronario agudo (Davies, 2000).

La enfermedad arterial coronaria y los procesos aterotrombóticos son los responsables de la mayoría de los eventos cardiovasculares, y suceden con mayor frecuencia en individuos con hipertensión, dislipemias, obesidad, diabetes, fallo renal y un historial familiar de enfermedad arterial coronaria, así como en personas sedentarias y fumadoras. Recientemente se ha clarificado que la resistencia a la insulina y la disfunción endotelial juegan un papel primordial en la patogénesis de la aterosclerosis, y numerosos estudios refuerzan la idea de que la resistencia a la insulina es la alteración fisiopatológica principalmente responsable del compendio de desórdenes metabólicos y cardiovasculares, conocidos comúnmente como Síndrome Metabólico (DeFronzo, 2010). La disfunción endotelial es un componente esencial del Síndrome Metabólico o Síndrome de resistencia a la insulina, y está ampliamente demostrado que, tanto en arterias coronarias, como en lechos periféricos, puede producir alteraciones en la vasodilatación y/o incremento de la vasoconstricción, como bien se ha explicado en apartados anteriores. Por ello, la función endotelial se considera un “biomarcador” de la enfermedad vascular (Verma et al., 2003), y representa un nexo de unión entre los complejos fenómenos a nivel molecular y la patología vascular de la aterosclerosis (Rask-Madsen y King, 2007), ya que alteraciones en la función endotelial pueden reducir la capacidad dilatadora de la microvasculatura coronaria.

### 3.1. Fisiología de la circulación coronaria

Hay dos arterias coronarias principales, la izquierda y la derecha, que se originan en el seno coronario justo por encima de la válvula aórtica. La arteria coronaria izquierda se extiende alrededor de 3.2 cm con el nombre de arteria coronaria izquierda principal y luego se divide en las ramas descendente, anterior y circunfleja. La arteria descendente anterior izquierda atraviesa un canal formando entre los dos ventrículos y emite ramas diagonales que irrigan el ventrículo izquierdo, además de ramas perforantes que irrigan la porción anterior del tabique interventricular y el músculo papilar anterior del ventrículo izquierdo. La rama circunfleja de la arteria coronaria izquierda se dirige hacia la izquierda y hacia atrás por el canal que separa la aurícula del ventrículo izquierdo y emite ramas que irrigan la pared lateral izquierda del ventrículo izquierdo. La arteria coronaria derecha corre por el canal auriculoventricular (AV) derecho y sus ramas irrigan el ventrículo derecho. Por lo general la arteria coronaria derecha se dirige a la parte posterior del corazón donde forma la arteria descendente anterior, que irriga esa zona (el tabique interventricular, el nodo AV y el músculo papilar posterior). El nodo sinoauricular recibe irrigación de la arteria coronaria derecha. En el 10 al 20 % de los pacientes es la arteria circunfleja, y no la coronaria derecha, la que se dirige hacia atrás para formar la arteria descendente posterior (Guyton y Hall, 2006; Ganz y Ganz, 2001)

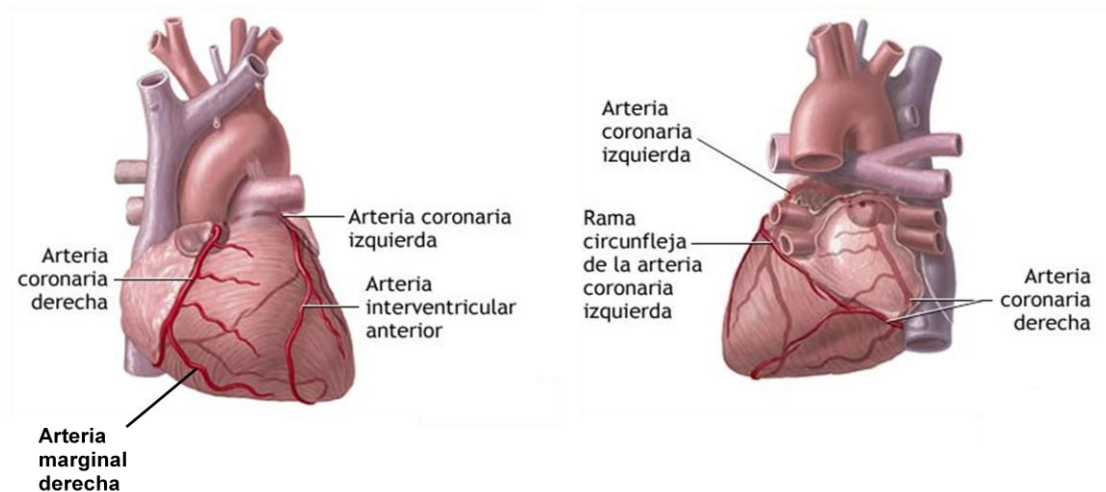


Figura X. Circulación coronaria anterior (izquierda) y posterior (derecha).

Aunque las arterias coronarias grandes no se conectan entre sí, hay canales anastomóticos que unen las arteriolas pequeñas. Cuando se produce la oclusión gradual de los vasos más grandes, los colaterales más pequeños aumentan de tamaño y aportan canales alternativos para el flujo sanguíneo. Una de las razones por las cuales las coronariopatías no producen síntomas hasta que están muy avanzadas es que el desarrollo de los canales colaterales se produce al mismo tiempo que los cambios ateroscleróticos.

Las arterias coronarias nacen de la aorta justo por fuera de la válvula aórtica; por lo tanto, el factor más importante responsable de la perfusión de las arterias coronarias es la presión de la arteria aorta. Los cambios en esta presión producen modificaciones paralelas en el flujo sanguíneo coronario.

Además de generar las presiones aórticas que impulsan la sangre a través de los vasos coronarios, las contracciones del músculo cardíaco influyen sobre su propia irrigación al comprimir los vasos sanguíneos intramiocárdicos y subendocárdicos (Guyton y Hall, 2006; Ganz y Ganz, 2001). Las arterias coronarias epicárdicas grandes corren por la superficie del corazón, mientras que las intramiocárdicas más pequeñas se ramifican y penetran en el miocardio antes de fusionarse con la red o el plexo de vasos subendocárdicos. Durante la sístole la contracción del músculo cardíaco comprime los vasos intramiocárdicos que irrigan los vasos del plexo subendocárdico y el aumento de la presión ventricular produce compresión adicional de estos vasos. Como consecuencia el flujo sanguíneo que atraviesa los vasos subendocárdicos es menor durante la sístole en comparación con el que pasa por los vasos coronarios externos. Para compensar, los vasos subendocárdicos son mucho más abundantes que las arterias más externas y esto permite un incremento desproporcionado del flujo subendocárdico durante la diástole. Como el flujo sanguíneo se desarrolla sobre todo durante esta etapa, la disminución de la presión diastólica o el aumento de la presión diastólica intraventricular en forma suficiente para comprimir los vasos pertenecientes al plexo subendocárdico pueden producir isquemia en infarto subendocárdicos (Guyton y Hall, 2006; Ganz y Ganz, 2001). La frecuencia cardíaca también influye sobre el flujo sanguíneo intramiocárdico porque cuando es más rápida disminuye bastante la duración de la diástole.

El músculo cardíaco depende, en primer término, de los ácidos grasos y el metabolismo aeróbico para cubrir sus necesidades energéticas. Aunque el corazón puede desarrollar un metabolismo anaeróbico, este proceso depende del aporte continuo de glucosa y produce grandes cantidades de ácido láctico. Por lo general el flujo sanguíneo es regulado

por la necesidad de oxígeno. Incluso en condiciones de reposo normal el corazón extrae y utiliza entre el 60 y el 80 % del oxígeno presente en la sangre que atraviesa las arterias coronarias, en comparación con la extracción del 25 al 30 % observada en el músculo esquelético. Como queda una reserva de oxígeno escasa en la sangre, cuando aumenta la actividad del miocardio las arterias coronarias deben incrementar su flujo para cubrir sus necesidades metabólicas. El flujo sanguíneo que atraviesa las arterias coronarias en condiciones de reposo normales es alrededor de 225 mL/minuto (Guyton y Hall, 2006). Durante el ejercicio intenso el flujo coronario puede aumentar entre cuatro y cinco veces para alcanzar los requerimientos de energía exigidos por el corazón.

Uno de los determinantes principales del flujo sanguíneo coronario es la actividad metabólica del corazón. Aunque todavía no se ha establecido la conexión exacta entre la tasa metabólica cardíaca y el flujo sanguíneo coronario, parece haber una asociación con la secreción de mediadores metabólicos producidos como resultado de la disminución de la relación entre la entrega y la demanda de oxígeno. Muchos investigadores han propuesto que el descenso de la concentración de oxígeno en el corazón provoca la liberación de sustancias vasodilatadoras desde los miocitos, que dilatan las arteriolas. La adenosina es una sustancia con una gran actividad vasodilatadora. En presencia de concentraciones muy bajas de oxígeno en los miocitos, una gran proporción de ATP celular se degrada a monofosfato de adenosina, pequeñas porciones del cual se degradan después y liberan la adenosina hacia los líquidos tisulares del músculo cardíaco, con el aumento consiguiente del flujo sanguíneo coronario local. Después de que la adenosina provoque vasodilatación, una gran parte de ella se reabsorbe hacia las células cardíacas para ser reutilizada. Las células miocárdicas en actividad también secretan iones potasio, ácido láctico y dióxido de carbono, que podrían tener también un papel en la regulación del flujo miocárdico, a pesar de que la adenosina tiene la acción vasodilatadora más potente y tal vez sea el mediador crucial en la regulación metabólica local (Guyton y Hall, 2006; Ganz y Ganz, 2001).

### 3.2. Aterosclerosis coronaria y cardiopatía isquémica

La cardiopatía isquémica implica trastornos del flujo sanguíneo miocárdico causados por la presencia de placas ateroscleróticas. La aterosclerosis es un tipo de arteriosclerosis o endurecimiento de las arterias. El término *aterosclerosis* proviene de la raíz griega *atheros* (que significa “pulpa” o “pasta”), y *sclerosis* (que significa “endurecimiento”) y representa la formación de lesiones fibroadiposas en la capa íntima de las arterias grandes y medianas, como la aorta y sus ramas, las arterias coronarias y los vasos grandes que irrigan el cerebro.

Las coronariopatías son la principal causa de muerte en los países desarrollados. Las complicaciones más importantes de la aterosclerosis, como la cardiopatía isquémica, el accidente cerebrovascular y la vasculopatía periférica, son responsables de más del 40 % de las muertes en los Estados Unidos (AHA, 2003). La aterosclerosis comienza en forma insidiosa y las manifestaciones clínicas de la enfermedad no suelen evidenciarse hasta entre 20 y 40 años más adelante. Más del 90 % de los pacientes con coronariopatías tienen aterosclerosis coronaria (Cotran et al., 1999) y la mayoría, o a veces todos, presentan una o más lesiones que reducen por lo menos un 75 % de la superficie transversal del vaso, porcentaje en el que el aumento del flujo sanguíneo provisto por la vasodilatación compensatoria ya no puede adaptarse siquiera a incrementos moderados en las demandas metabólicas en el miocardio (Cotran et al., 1999).

#### 3.2.1. Aterosclerosis como causa de cardiopatía isquémica

La aterosclerosis es la causa más frecuente de disminución del flujo sanguíneo coronario. En las personas que tienen una predisposición genética a la aterosclerosis, con hipercolesterolemia o estilo de vida sedentario, el colesterol se va depositando gradualmente por debajo del endotelio en muchos puntos de las arterias por todo el cuerpo. Estas zonas de depósito son invadidas paulatinamente por tejido fibroso y con frecuencia se calcifican. El resultado neto es el desarrollo de placas ateroscleróticas que hacen protrusión en la luz de los vasos y bloquean el flujo sanguíneo total o parcialmente. Un lugar frecuente de desarrollo de las placas ateroscleróticas son los primeros centímetros de las arterias coronarias mayores. La aterosclerosis puede comprometer una o las tres arterias coronarias y sus ramas. Las lesiones significativas desde el punto de vista clínico pueden localizarse en cualquier región de estos vasos pero tienden a predominar en los primeros centímetros de la arteria descendente

anterior izquierda y de la arteria circunfleja izquierda o en toda la arteria coronaria derecha (Cotran et al., 1999). A veces también se afectan ramas secundarias importantes.

La oclusión aguda de una arteria coronaria es más frecuente en una persona que ya tiene una cardiopatía coronaria aterosclerótica subyacente, pero no aparece casi nunca en una persona que tenga una circulación coronaria normal. La oclusión aguda puede ser consecuencia de varios factores (Guyton y Hall, 2006):

1. La placa aterosclerótica provoca la aparición de un coágulo de sangre en la zona, un trombo, que a su vez ocluye la arteria. El trombo se produce en lugares donde la placa aterosclerótica se ha roto a través del endotelio y entra en contacto directo con la sangre circulante. Como la placa tiene una superficie irregular, las plaquetas sanguíneas se adhieren a ella, se deposita fibrina y los eritrocitos quedan atrapados para formar el coágulo de sangre que crece hasta que ocluye el vaso. Otras veces el coágulo se rompe y se desprende del lugar de inserción en la placa aterosclerótica y se dirige hacia una rama más periférica del árbol arterial coronario, donde bloquea la arteria. El trombo que circula por la arteria de esta forma y ocluye el vaso más distalmente se denomina *émbolo coronario*.
2. También puede producirse el espasmo muscular local de una arteria coronaria. El espasmo podría ser consecuencia de la irritación directa del músculo liso de la pared arterial por los bordes de una placa aterosclerótica o de los reflejos nerviosos locales que provocan una contracción excesiva de la pared vascular coronaria. El espasmo provoca entonces la *trombosis secundaria del vaso*.

### 3.2.2. Importancia vital de la circulación colateral en el corazón

El grado de daño que sufre el músculo cardíaco por una constricción aterosclerótica de las arterias coronarias de desarrollo lento o por la oclusión coronaria súbita está determinado en gran medida por el grado de circulación colateral que se haya desarrollado o que pueda abrirse en minutos después de la oclusión. En un corazón normal no existen prácticamente comunicaciones importantes entre las arterias coronarias mayores, pero sí muchas anastomosis entre las arterias pequeñas que miden de 20 a 250 micras de diámetro.



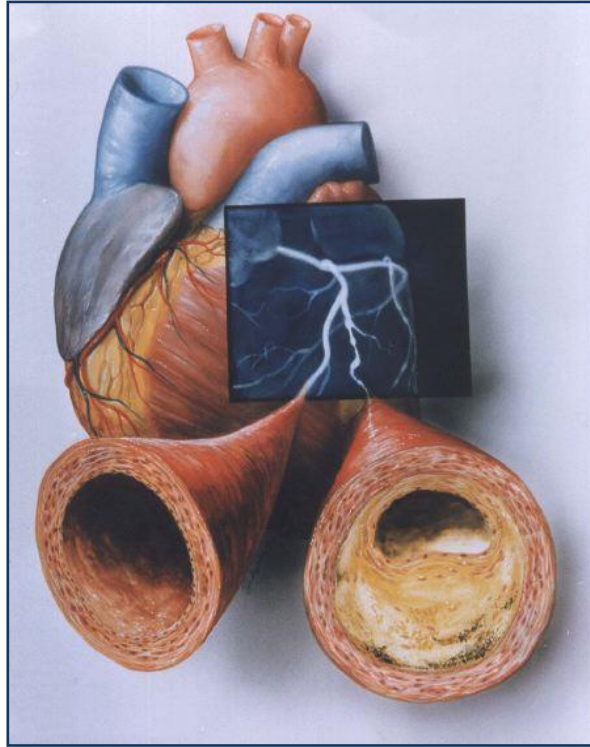
Cuando se produce una oclusión súbita en una de las arterias coronarias mayores las anastomosis pequeñas comienzan a dilatarse en segundos, pero el flujo que atraviesa estas colaterales diminutas suele ser menos de la mitad del necesario para mantener viva la mayor parte del músculo cardíaco que ahora irrigan; los diámetros de los vasos colaterales no aumentan mucho más en las siguientes 8-24 horas pero después el flujo colateral comienza a aumentar, doblándose hacia el segundo o tercer día y alcanzando a menudo un flujo coronario normal o casi normal al cabo de un mes. Muchos pacientes se recuperan casi completamente de grados variables de oclusión coronaria debido al desarrollo de estos canales colaterales, cuando la superficie afectada del músculo no es demasiado grande.

Cuando la aterosclerosis estenosa lentamente las arterias coronarias en un periodo de muchos años, y no bruscamente, se pueden desarrollar vasos colaterales al mismo tiempo cuando la aterosclerosis es cada vez más intensa. Por tanto, la persona puede no tener nunca un episodio agudo de disfunción cardíaca aunque, finalmente, el proceso aterosclerótico se desarrolla más allá de los límites que puede suministrar el aporte de sangre colateral para aportar el flujo sanguíneo necesario y, a veces, los propios vasos sanguíneos colaterales desarrollan aterosclerosis. Cuando esto sucede, el trabajo del músculo cardíaco queda gravemente limitado, a menudo tanto que el corazón no puede bombear ni siquiera las cantidades necesarias de flujo sanguíneo. Ésta es una de las causas más frecuentes de insuficiencia cardíaca que se presentan en la inmensa mayoría de los ancianos (Guyton y Hall, 2006).

### 3.2.3. Isquemia miocárdica silente

La isquemia miocárdica silente se produce en ausencia de dolor. Los factores que la causan parecen ser los mismos responsables que la angina: alteración del flujo sanguíneo a causa de aterosclerosis o vasoespasmo coronario. La isquemia miocárdica silente compromete a tres tipos de pacientes: los asintomáticos que no tienen otras evidencias de coronariopatía, los que sufrieron un infarto de miocardio y continúan con episodios de isquemia silente, y los que tienen angina y además episodios de isquemia silente (Cohn, 2005). La causa de la ausencia de dolor durante los episodios de isquemia no está clara. Estos acontecimientos podrían ser más breves y comprometer menos tejido miocárdico que los que producen dolor. Otra explicación es que los pacientes con angina silente tienen una alteración del umbral del dolor o de la transmisión del dolor, o una neuropatía autonómica con denervación sensitiva.

Hay evidencia compatibles con una aumento de la incidencia de isquemia miocárdica silente en los pacientes con diabetes mellitus, que es probable que se deba a la presencia de neuropatía autonómica como complicación frecuente de la diabetes (Chiariello e Indolfi, 1996).



**Figura XI. Imagen de la formación de una placa de ateroma en una arteria coronaria (derecha).**

### **3.3. Circulación coronaria en estados de resistencia a la insulina**

Existen evidencias que demuestran la existencia de alteraciones endoteliales en la circulación periférica de personas con resistencia a la insulina utilizando métodos directos (Steinberg et al., 1996; Balletshofer et al., 2000), sin embargo, son muy escasos los estudios de medida directa de la circulación coronaria. Aunque los síndromes isquémicos, agudos y crónicos, son comúnmente debidos a placas de ateroma que limitan el flujo coronario, aproximadamente el 10-20 % de los pacientes con síntomas sometidos a caracterización cardiaca, han mostrado angiogramas coronarios normales (Cannon et al, 1992). Sin embargo sí ha sido demostrado que a pesar de la presencia de angiogramas coronarios normales, la reserva del flujo coronario se encuentra reducida en pacientes diabéticos (Nitenberg et al., 1993), lo que ha sugerido que la aterosclerosis coronaria podría no ser la única patología subyacente a las alteraciones en la vasodilatación coronaria en pacientes diabéticos (Nitenberg

et al., 1993; Nahser et al., 1995). Realizando una angiografía cuantitativa, Nitenberg y colaboradores (1993) demostraron el daño en la vasodilatación coronaria utilizando una prueba de frío a presión en pacientes diabéticos tipo 2. Utilizando la misma metodología, Kaneda y colaboradores (2006) realizaron un estudio en el cual 165 pacientes se sometieron a la inyección intracoronaria de ACh, y encontraron que la diabetes era un potente predictor del vasoespasma inducido por acetilcolina (ACh), como indicador de la disfunción endotelial (Kaneda et al., 2006). Además, en arteriolas coronarias aisladas de corazones de pacientes diabéticos, se demostró la alteración a la vasodilatación dependiente de ATP y mediada por canales de  $K^+$  (Hasdai et al., 1998). Estas evidencias demuestran que en el Síndrome Metabólico y diabetes mellitus se asocian a respuestas vasodilatadoras disminuidas, no sólo en arterias periféricas, también en el lecho coronario.

Se han obtenido datos en modelos animales de Síndrome Metabólico que también indican la presencia de hiperglucemia en ayuno, y por lo tanto, la presencia de diabetes, alteración en la vasodilatación coronaria y en el incremento del flujo intraluminal (Sowers et al., 2001; Creager et al., 2003; Cersosimo y DeFronzo, 2006; Camici y Crea, 2007). Oltman y colaboradores (2006), demostraron en arterias coronarias de ratas Zucker obesas, que la dilatación a la ACh estaba disminuida, aunque en las mismas ratas prediabéticas de menor edad, no existía dicha alteración. Existen otros estudios que han encontrado preservada, o incluso incrementada, la vasodilatación de las arterias coronarias de animales prediabéticos o con obesidad inducida por una dieta rica en grasas. Jebelovszki y colaboradores (2008) observaron que en arteriolas coronarias de ratas obesas, la actividad de la guanilil ciclasa soluble (GCs) se ve incrementada, provocando el aumento en la sensibilidad al NO, probablemente para preservar la vasodilatación dependiente de NO y la perfusión coronaria en la obesidad. En nuestro laboratorio recientemente se ha demostrado que en arterias coronarias de ratas prediabéticas existe una sobreproducción de prostanoïdes relajantes por la vía COX-2 (Sánchez et al., 2010). Parece que durante la progresión del Síndrome Metabólico la función coronaria se encuentra protegida antes del desarrollo de la diabetes mellitus tipo 2, a diferencia de otros lechos vasculares periféricos., lo que implicaría que los vasos coronarios poseen mecanismos que protegen su función vasomotora, o cuentan con mecanismos compensadores de la pérdida de las vías vasodilatadoras que sucede durante la progresión del Síndrome Metabólico (Szerafin et al., 2006; Fulop et al., 2007; Knudson et al., 2007; Villalba et al., 2009; Sánchez et al., 2010).

Debido a que la utilización de oxígeno por el miocardio es máxima (Tune et al., 2003), el deterioro de la vasodilatación coronaria podría tener importantes consecuencias sobre la perfusión miocárdica. La circulación coronaria coordina el flujo sanguíneo con los requerimientos de oxígeno, regulando la resistencia según el calibre vascular, y con diferentes mecanismos de regulación en cada zona (Jones et al., 1995; Chilian, 1997). Oltam y colaboradores (2000) también observaron diferencias en la reactividad a la insulina entre las arterias coronarias conducción, donde la hormona indujo una ligera relajación, y los microvasos coronarios, en los que la insulina indujo relajaciones mucho más potentes.

Prior y colaboradores (2005) realizaron un estudio en 120 pacientes con resistencia a la insulina de diferentes grados de severidad, desde índices glucémicos normales aunque con hiperinsulinemia, individuos con la tolerancia a la glucosa deteriorada, y paciente con diabetes mellitus tipo 2, con y sin hipertensión. Encontraron que el flujo miocárdico hiperémico, se encontraba disminuido, y por lo tanto, también la capacidad vasodilatadora. Estos hallazgos indican un leve deterioro funcional debido a la resistencia a la insulina en estados pre-diabéticos, lo que se atribuye, inicialmente, a alteraciones endoteliales, más severas en estados de resistencia a la insulina más graves, e incluso la capacidad vasodilatadora se puede ver comprometida completamente. Además, la disminución de flujo miocárdico en respuesta a la estimulación simpática, probablemente refleja la una menor biodisponibilidad de NO, debido a que su síntesis se encuentra reducida, o a que su inactivación se encuentra acelerada, o bien a ambos. Este fenómeno podría ser el resultado de alteraciones en la vía de señalización de PI3K/Akt/eNOS activada por la insulina. Así, un estudio en voluntarios jóvenes y sanos concluyó que la inhibición de la síntesis del NO atenuaba la perfusión miocárdica durante la hiperemia inducida por adenosina, indicando que la vasodilatación coronaria por adenosina es, en parte, dependiente del endotelio (Buus et al., 2001).

Los mecanismos que deterioran progresivamente la circulación coronaria en estados de resistencia a la insulina no están claros, pero se podría apuntar al incremento en el número de factores estresantes vasculares, incluyendo los niveles elevados de ácidos grasos circulantes, triglicéridos, oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) o hipercolesterolemia. También contribuyen a la disminución en la producción e inactivación de NO las citoquinas proinflamatorias, y otros marcadores de la inflamación como la proteína C reactiva o adipocinas derivadas del tejido adiposo. Otros factores que podrían dañar la función vascular son la formación de especies reactivas de oxígeno en estados de hiperglucemia, junto con la inactivación de la proteína cinasa C (Hink U et al., 2001; Mather et al., 2001). Yokoyama

y colaboradores (1998) observaron que existía un mayor flujo miocárdico hiperémico en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 con un control adecuado de la glucemia, comparados con pacientes de glucemia descontrolada, independientemente de los niveles de resistencia a la insulina o hiperinsulinemia, lo que resalta el papel dominante de la hiperglucemia en la disfunción vascular coronaria.

Tampoco está claro si las alteraciones vasomotoras en la diabetes clínica afectan directamente a la función del músculo liso vascular coronario. Existen estudios en individuos sanos donde se ha visto reducida la capacidad vasodilatadora de la adenosina, aproximadamente un 30 %, tras la inhibición de la eNOS (Buus et al., 2001), lo que sugiere que la reducción en el flujo sanguíneo hiperémico durante la diabetes mellitus tipo 2 podría ser resultado de la menor biodisponibilidad de NO, posiblemente relacionado con los efectos aditivos de los múltiples estresores.

Las alteraciones de la estructura vascular también podrían provocar una disminución en la capacidad vasodilatadora en la diabetes mellitus tipo 2, como demostraron Wackers y colaboradores (2004) mediante imágenes de perfusión miocárdica, observando que las reducciones de la respuesta vasodilatadora podrían estar confinadas a territorios miocárdicos irrigados por vasos coronarios con enfermedad vascular. La detección de isquemia asintomática en diabetes se realizó en 1123 pacientes con diabetes mellitus tipo 2, de los cuales se estudiaron aleatoriamente 522 con esta técnica, y al menos una cuarta parte de ellos mostraron isquemia silente, el 16 % mostraron algún tipo de alteración en la perfusión intramiocárdica, y sólo el 6 % tuvieron una perfusión miocárdica normal (Wackers et al., 2004). Otros estudios afirman que el flujo miocárdico hiperémico se encontró reducido un 28 % en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 y con enfermedad macro-vascular coronaria comparados con sujetos sanos, y además, se redujo en un 57 % en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 y microangiopatía coronaria (Yokoyama et al., 2000). Esto demuestra que alteraciones microestructurales también afectan a la circulación coronaria.

La disfunción endotelial podría ser responsable del fallo en el incremento del flujo coronario normal, incluso en ausencia de lesiones coronarias macro-vasculares, ya que puede inducir a la isquemia miocárdica (Zeiher et al., 1995). Cuando coexiste con la enfermedad arterial coronaria obstructiva, la disfunción endotelial podría causar profundas alteraciones en la perfusión inducida en situaciones de estrés, probablemente debido a la vasoconstricción simpática que se produce durante el estrés o el ejercicio (Hess et al., 1990; Verna et al., 2007).

También se ha observado que los niveles de insulina circulantes tienen importantes efectos sobre el flujo miocárdico, tanto en reposo como durante la estimulación miocárdica hiperémica. Así, la infusión de insulina en sujetos sanos y en pacientes diabéticos incrementa el flujo miocárdico en reposo (Iozzo et al., 2002b; Sundell et al., 2002), y la infusión aguda de insulina también incrementa significativamente el flujo en pacientes con enfermedad arterial coronaria, y diabetes mellitus tipo 2 (Lautamäki et al., 2006).

### 3.3.1. Circulación coronaria y obesidad

La obesidad se asocia directamente con el aumento del riesgo de aterosclerosis coronaria y mortalidad cardiovascular, y es un factor de riesgo independiente para la enfermedad arterial coronaria. Además está ampliamente aceptado que la obesidad se asocia a la hipertrofia ventricular izquierda, lo que produce a su vez disfunción en la contracción cardíaca sistólica y diastólica (Abel et al., 2008). Se producen adaptaciones fisiológicas de la función cardíaca ante el engrosamiento de la pared ventricular, para acomodar la mayor demanda metabólica y hemodinámica existente en la obesidad y al incremento de masa muscular y/o adiposa, que requieren un mayor rendimiento cardíaco y volumen intravascular para hacer frente a los requerimientos metabólicos elevados (Lavie y Messerli, 1986). El incremento del índice de masa corporal está asociado con el incremento del gasto cardíaco y la disminución de la resistencia vascular periférica. Estos cambios pueden ser atribuidos a la alteración de la estructura cardíaca o a la disfunción contráctil, y podrían estar relacionados con alteraciones en la función coronaria y la resistencia de la vasculatura periférica, aunque estos mecanismos aún no están bien clarificados.

Los cambios morfológicos en los microvasos durante la obesidad, son realmente raros antes del desarrollo de hiperglucemia. Las alteraciones patológicas relacionadas con la obesidad, como dislipemia aterogénica, resistencia a la insulina e hiperinsulinemia, deterioran la función vasomotora de pequeñas arterias. Sin embargo, rara vez se altera el flujo sanguíneo de varios sistemas de órganos a menos que se desarrolle aterosclerosis en sus arterias. Actualmente, no existen muchas evidencias acerca del impacto de la obesidad sobre la regulación vasomotora de los microvasos coronarios (Jebelovszki et al., 2008).

Se ha demostrado la existencia de disfunción endotelial tanto en la circulación periférica, mediante medidas del flujo sanguíneo en el antebrazo, como en la circulación coronaria, de pacientes obesos mediante angiografía (Steinberg et al., 1996, 2000b; Hashimoto et al., 1998; Suwaidi et al., 2001). Además, está descrito que la disfunción endotelial empeora progresivamente con el incremento de peso corporal (Suwaidi et al., 2001). La disfunción endotelial ha sido confinada a las arterias coronarias de resistencia sin involucrar los vasos conductores epicárdicos. Se considera que la resistencia a la insulina podría ser una causa posible de disfunción endotelial, debido a la coexistencia de elevados niveles de glucosa y triglicéridos durante la misma. Algunas observaciones recientes basadas en medición por PET del flujo miocárdico, revelan alteraciones similares en la circulación coronaria de personas obesas, ya que la función vasomotora coronaria se ve deteriorada progresivamente con el incremento del índice de masa corporal (IMC). En este estudio observaron que la capacidad vasodilatadora total permanece inalterada e personas con sobrepeso, de IMC entre 25 y 30 Kg/m<sup>2</sup>, pero fue significativamente disminuida en personas obesas con IMC superior a 30 Kg/m<sup>2</sup>. En este estudio se analizaron gran cantidad de parámetros, sin embargo, la edad y el IMC fueron los dos únicos predictores de alteraciones en la función endotelial coronaria (Schindler et al., 2006). Las razones que relacionan la disfunción endotelial coronaria con la edad son desconocidas, sin embargo sí se ha descrito el desarrollo de resistencia a la insulina cuando la obesidad es mantenida en el tiempo. Estos datos podrían ser el nexo de unión entre obesidad e incremento de morbilidad y mortalidad cardiovascular.

Son pocos los estudios que investigan las alteraciones en las respuestas vasomotoras de los vasos coronarios en pacientes obesos. Sin embargo, otros estudios demuestran la estrecha relación entre la función vasomotora coronaria y la relajación de la arteria braquial, y se especuló que la obesidad podía afectar negativamente a las vasodilataciones coronarias (Anderson et al., 1995; Takase et al., 1998). Además, el flujo sanguíneo miocárdico, medido por PET, se encontró disminuido en mujeres post-menopáusicas con obesidad, lo que fue correlacionado negativamente con el ratio de los perímetro de la cintura con respecto al de la cadera (Martin et al., 2005). Fulop y colaboradores (2007) encontraron que en arteriolas coronarias aisladas de pacientes normotensos, la obesidad estaba asociada a la reducción de las relajaciones coronarias. Sin embargo este estudio encontró que durante la presencia simultánea de hipertensión y obesidad, las relajaciones coronarias a la bradicinina y a donadores de NO fueron significativamente mayores, y se encontraron correlacionadas positivamente con el IMC (Fulop et al., 2007). En otros estudios, los vasos coronarios de

pacientes diabéticos muestran preservadas o incluso incrementadas las vasodilataciones endoteliales (Miura et al., 1999; Szerafin et al., 2006).

Todas estas observaciones indican que la obesidad, especialmente en presencia de comorbilidades como hipertensión y diabetes, no está inicialmente asociada al deterioro de la función vasodilatadora coronaria. Por el contrario, es posible que la presencia de obesidad pudiera tener un papel importante en el mantenimiento de la capacidad vasodilatadora de los vasos coronarios. Así, estudios clínicos en pacientes obesos con enfermedad coronaria, han mostrado un pronóstico favorable sobre eventos cardiovasculares agudos, y el peor pronóstico fue asociado a pacientes con peso inferior al normal (Horwich y Fonarow, 2002; Hall et al., 2005; Habbu et al., 2006). A pesar de que está ampliamente aceptado que la obesidad es un factor de riesgo para la enfermedad arterial coronaria y el fallo cardíaco, existen evidencias del papel protector de la obesidad una vez que los pacientes han desarrollado la enfermedad cardiovascular (Horwich y Fonarow, 2002; Hall et al., 2005), lo que podría estar relacionado con las respuestas adaptativas en el lecho vascular coronario.



#### **4. RESISTENCIA VASCULAR A LA INSULINA Y DISFUNCIÓN ERÉCTIL**

##### **4.1. Fisiología de la erección**

La erección es la consecuencia de modificaciones en la irrigación de los cuerpos cavernosos del pene bajo el control de los nervios vasomotores, aumentando el flujo arterial y reduciendo la evacuación venosa, lo cual tienen como resultado la distensión de los cuerpos cavernosos. En este proceso intervienen mecanismos complejos que requieren la integridad anatómica, tanto vascular como nerviosa, así como también la acción coordinada de diversos neurotransmisores y mediadores paracrinos (Andersson y Wagner, 1995; Andersson, 2001, Simonsen et al., 2002; Prieto, 2008).

El pene es el órgano terminal del aparato urinario y del sistema de vías espermáticas del aparato genital masculino. Se compone principalmente de dos masas dorsales de tejido eréctil, los cuerpos cavernosos y una masa ventral de tejido, el cuerpo esponjoso, en el cual se incluye la uretra. Una densa capa fibroelástica, la túnica albugínea (de 2-3 mm en estado flácido) une a las tres masas y forma una cápsula que las rodea; ésta consta de varias subcapas compuestas de fibras de colágeno, aunque también se pueden encontrar fibras elásticas que están dispuestas de modo diferencial, pues mientras en la capa más interna adoptan una posición circular, en la más externa es longitudinal. La túnica albugínea del cuerpo esponjoso es mucho más fina y contiene más fibras elásticas (Godstein y Padma-Nathan, 1990; Hsu et al., 1992; Anderson y Wagner, 1995). El tejido cavernoso está compuesto por una red de espacios interconectados, tapizados por endotelio vascular y separados por trabéculas, denominados sinusoides cavernosos. Está constituido por haces de músculo liso inmersos en un soporte de colágeno, elastina y fibroblastos (Goldstein y Padma-Nathan, 1990). Los dos cuerpos cavernosos y el cuerpo esponjoso constituyen el tejido eréctil del pene que recibe sangre arterial de las arterias pudendas internas. De éstas derivan las arterias dorsales del pene, que se encuentran cerca de la superficie dorsal del pene en la túnica albugínea y por otra parte, las arterias cavernosas que discurren en sentido longitudinal a través de cada cuerpo cavernoso, y cuyas ramas son las arterias helicinas. Dos arterias bulbouretrales discurren longitudinalmente a través del cuerpo esponjoso en dirección ventral con respecto a la uretra. Estas arterias terminan en pequeños capilares que se abren en forma directa en los espacios cavernosos. Aumentan en tamaño y rigidez al llenarse de sangre los cuerpos cavernosos derivada en su mayoría de las arterias helicinas, que son ramas de segundo o tercer orden de

la arteria cavernosa profunda. El retorno venoso se realiza por la vena dorsal superficial y por la vena dorsal profunda. Las venas emisarias que recorren la túnica albugínea permiten el drenaje sanguíneo hacia la vena dorsal profunda a través de las venas circunflejas (Andersson y Wagner, 1995).

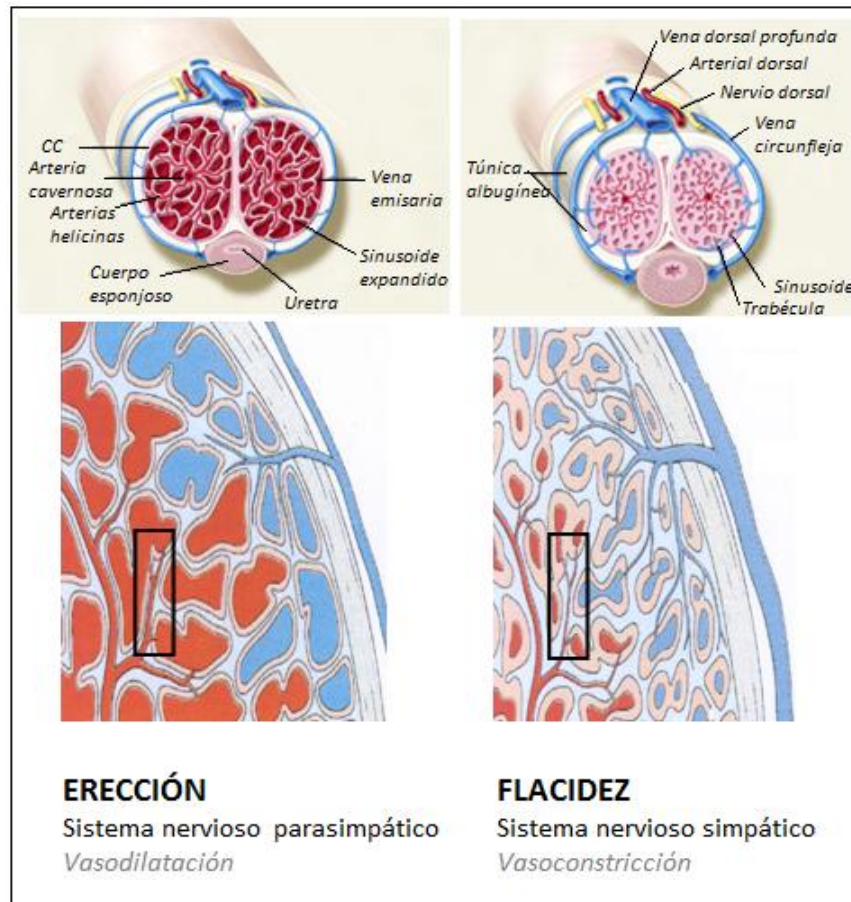
La erección tiene lugar cuando el flujo sanguíneo que entra en el pene supera al flujo de salida. Así, la estimulación sexual activa los nervios parasimpáticos y liberación de NO y otros neurotransmisores relajantes como ACh o el péptido intestinal vasoactivo (VIP) de las terminales nerviosas y del endotelio, disminuyendo la resistencia vascular e incrementando el flujo sanguíneo a de las arterias cavernosas y helicinas, lo que permite el llenado de los sinusoides cavernosos, así como el incremento de la presión intracavernosa. Esto genera una restricción del flujo venoso por compresión mecánica de la vena subtúnica contra la túnica albugínea, con el consecuente atrapamiento de la sangre a presión en los cuerpos cavernosos. Además se produce una elongación en las vénulas, reduciendo así su diámetro, lo que dificulta el flujo de salida de la sangre a través de unas venas más largas y estrechas. Este fenómeno se conoce como mecanismo *venooclusivo* y facilita el proceso de erección (Adersson y Wagner, 1995; Simonsen et al., 1995, 1997a, 2002; Prieto, 2008).

El pene está innervado por fibras nerviosas autónomas y somáticas. La estimulación de los nervios sacros parasimpáticos conduce a la erección, mientras que la actividad de los nervios simpáticos lumbares origina la vasoconstricción peneana y es responsable de la detumescencia y del mantenimiento del estado de flacidez (Anderson y Wagner, 1995). Mientras que los nervios adrenérgicos son los principales mediadores de la contracción arterial y trabecular en la detumescencia, los procesos de relajación que conducen a la erección están bajo el control de nervios colinérgicos y no-adrenérgicos no-colinérgicos (NANC) que liberan NO y otros mediadores de naturaleza peptídica como el VIP (Anderson y Wagner, 1995; Simonsen et al., 2002). Además de la participación coordinada del sistema nervioso periférico, existe un patrón central en el control nervioso de la erección, en el que están involucrados al menos dos factores: factores psicógenos y reflexógenos (De Groat y Booth, 1993).

Los procesos de erección y detumescencia han sido descritos y divididos en siete fases por diferentes investigadores (Batra y Lue, 1991; Anderson y Wagner, 1995; Aboseif y Lue, 1988):

- *Fase 0 - de flacidez*: Durante la fase de flacidez, el pene está bajo el dominio del sistema nervioso simpático; las arterias peneanas y cuerpos cavernosos se encuentran contraídos. El flujo sanguíneo a través de las arterias es mínimo y con fines nutricionales; además, existe un flujo de salida libre desde las vénulas subalbugíneas a las venas emisarias.
- *Fase 1 - de latencia o de llenado*: Tras la estimulación sexual existe un predominio local del sistema nervioso parasimpático, lo que induce vasodilatación arterial incremento así en el flujo sanguíneo, sin modificaciones en la presión sistémica. La resistencia periférica disminuye como consecuencia de la dilatación de las arterias cavernosas y helicinales. El pene se alarga a pesar de que la presión intracavernosa permanece inalterada.
- *Fase 2 - fase de tumescencia*: Incrementa rápidamente el flujo de entrada y como consecuencia, también la presión intracavernosa. Debido a la relajación del músculo liso trabecular, el llenado de los cuerpos cavernosos aumenta de forma importante causando engrosamiento y erección. Al final de esta fase el flujo arterial disminuye.
- *Fase 3 - de erección completa*: El músculo liso trabecular dilatado se expande y unido al incremento en el volumen de sangre, se produce una compresión de las vénulas subtúnicas contra la túnica albugínea disminuyendo el flujo venoso de salida (mecanismo venooclusivo) e incrementan la presión intracavernosa (aproximadamente 100 veces más) y la presión arterial sistémica.
- *Fase 4 - de erección rígida o esquelética*: La presión intracavernosa incrementa muy por encima de la presión sistólica como consecuencia de una contracción voluntaria o refleja de los músculos isquiocavernosos y bulbocavernosos debido a la estimulación del glande, lo que provoca un incremento de la rigidez peneana. En esta fase no existe flujo sanguíneo a través de la arteria cavernosa.
- *Fase 5 - de transición*: El incremento en la actividad del sistema nervioso simpático conduce a un incremento en el tono de las arterias helicinales y la contracción del músculo liso trabecular. El flujo arterial disminuye y el mecanismo venooclusivo permanece activo.
- *Fase 6 - de detumescencia inicial*: Existe un moderado descenso de la presión intracavernosa indicando una reapertura de los canales venosos de salida, y un descenso del flujo arterial.

→ *Fase 7 - de detumescencia rápida*: La presión intracavernosa disminuye rápidamente, el mecanismo *venooclusivo* se inactiva completamente, el flujo arterial disminuye a los niveles de la preestimulación y el pene regresa al estado de flacidez.



**Figura XII.** La erección está determinada por la vasodilatación (izquierda), mientras que la flacidez por la vasoconstricción de las arterias penianas y de los cuerpos cavernosos (derecha).

#### 4.1.1. Regulación fisiológica de la erección: vasodilatadores y vasoconstrictores

La erección y la flacidez penianas están reguladas, en última instancia por la relajación y la contracción respectivas del músculo liso de las arterias penianas y de los cuerpos cavernosos. En su regulación intervienen diversos neurotransmisores, hormonas, autacoides y factores endoteliales siendo todos ellos los que en última instancia determinan, a través de sus mecanismos de señalización intracelular, la modulación del tono vascular (Anderson y Wagner,

1995). El desequilibrio entre los factores relajantes y contráctiles en los cuerpos cavernosos, arterias y venas peneanas, es la principal causa de la disfunción eréctil (DE) orgánica.

#### 4.1.1.1. *Regulación de la erección: factores vasodilatadores*

La relajación del músculo liso peneano depende de mecanismos de diversa naturaleza: nerviosos, endocrinos, paracrinós (sustancias relajantes liberadas desde el endotelio vecino) y autocrinos (factores generados en el propio músculo liso), mostrando todos ellos un papel importante en la erección peneana.

**Inervación nitrérgica y colinérgica:** La erección comienza por la activación parasimpática de los nervios pélvico o cavernoso que se produce tras la estimulación sexual. El NO de origen nervioso es un mediador importante de la relajación del músculo liso del pene dando lugar al llenado de los sinusoides y desencadenando el proceso de erección. Los nervios colinérgicos liberan ACh, la cual a través de receptores muscarínicos potencia la liberación de NO de fibras nitrérgicas, produciendo así relajación del músculo liso. La ACh actúa sinérgicamente sobre los receptores presinápticos muscarínicos localizados en los nervios simpáticos inhibiendo la liberación de noradrenalina, y por tanto, disminuyendo el tono simpático adrenérgico (Saenz de Tejada et al., 2004). Por otra parte se ha demostrado que la ACh y el NO coexisten en las mismas neuronas parasimpáticas que controlan el tono arterial peneano (Hedlund et al., 1999, 2000). En estudios iniciales se observó que la erección peneana inducida por la estimulación eléctrica del nervio cavernoso era abolida por los inhibidores de NOS (Hellstrom et al., 1994). Hurt y colaboradores (2002) demostraron que tanto la estimulación del nervio cavernoso como la relajación inducida por algunos agonistas estaban mediadas por la enzima PI3K y por la activación de la Akt. Dicha ruta interviene en la fosforilación directa del enzima eNOS independientemente de la elevación en la  $[Ca^{2+}]_i$  y su activación incrementa la producción endotelial de NO (Fulton et al., 1999). Así, las enzimas nNOS y eNOS intervienen en la iniciación y en el mantenimiento de la erección máxima, respectivamente, y la tumescencia completa sería el resultado de una amplificación de las acciones del NO derivado de la eNOS, tras la relajación previa iniciada por el NO de origen nervioso (Burnett, 1998). Las señales de origen nervioso (reflexogénicas) inician el proceso de erección mediante la activación de la nNOS como consecuencia de la entrada de  $Ca^{2+}$  subsiguiente a la despolarización neuronal y su unión a la CaM (Bredt y Snyder, 1990). Esta activación de la nNOS dependiente de  $Ca^{2+}$ /CaM es reversible y breve en el tiempo, pero la

vasorelajación inducida por el NO nervioso provoca el incremento del flujo sanguíneo y la consecuente expansión de los vasos sanguíneos penenanos y llenado de los sinusoides cavernosos.

La actividad de la nNOS en la vasculatura peneana y los cuerpos cavernosos se encuentra modulada por diversos factores como neurotransmisores, hormonas, autacoides y presión de oxígeno. Así, la noradrenalina inhibe la liberación de NO mediante  $\alpha_2$ -adrenoreceptores presinápticos localizados en las terminaciones nerviosas de las arterias de resistencia peneanas (Simonsen et al., 1997a). Además existe una presencia importante de nervios que contienen péptido intestinal vasoactivo (VIP) en el pene, el cual induce potentes vasodilataciones y probablemente actúe como facilitador presináptico en la neurotransmisión nitrérgica (Simonsen et al., 2001). Debido a que el oxígeno molecular ( $O_2$ ) es un sustrato para la síntesis de NO, la presión parcial de  $O_2$  juega un papel importante en la regulación hemodinámica del cuerpo cavernoso, ya que la hipoxia en el tejido eréctil altera la expresión y actividad de nNOS y eNOS, y con ello disminuye la síntesis de NO (Azadzi, 2006).

**NO de origen endotelial:** El endotelio vascular es una capa monocelular que recubre toda la capa interna de la superficie de los vasos, ejerciendo de intermediario entre la sangre y el músculo liso vascular. El endotelio ha sido considerado como una simple barrera física, sin embargo, hoy en día está ampliamente reconocido su papel como mediador activo en la regulación del tono vascular. Por la naturaleza de su localización, regula eventos biológicos como el mantenimiento de la presión vascular correcta, la permeabilidad y la perfusión, inhibidor de trombosis, inductor de fibrinólisis, regulación de la inflamación y agregación plaquetaria y el comportamiento del músculo liso vascular. En definitiva, es encargado del mantenimiento de la homeostasis vascular, y capaz de responder ante diferentes estímulos humorales, neuronales y mecánicos a través de la síntesis y liberación de muchos compuestos, y por todo ello cobra gran importancia en la regulación del tono vascular peneano, y por tanto de la erección. Uno de los compuestos más importantes generado a nivel endotelial es el NO, con importantes funciones a nivel fisiológico como son la regulación del tono vascular, la neurotransmisión, la citotoxicidad celular ante agentes patógenos o células tumorales, y la erección peneana (Burnett, 1995; Ignarro, 1999; Bogdan, 2001). La síntesis de NO y la vía del eNOS/GMPc juegan un papel esencial en el mantenimiento y control fisiológico de la erección peneana (Burnett, 2004). El NO está implicado en los eventos de señalización intracelular y en la neurotransmisión y la regulación del tono vascular peneano y puede ser producido tanto por la eNOS localizada en las células endoteliales que tapizan los cuerpos cavernosos, como en el

endotelio de las arterias peneanas, así como producido en respuesta a las fuerzas de cizallamiento o “shear stress”, o bien en respuesta a agonistas como la ACh liberada desde las terminaciones nerviosas colinérgicas, o por la actividad de la nNOS en neuronas NANC, como se ha explicado en el apartado anterior. La importancia de la vía del GMPc/proteína cinasa G (PKG) en la erección peneana ha sido establecida en ratones en los que se ha eliminado el gen que codifica para dicha proteína identificando así a esta enzima como la diana fisiológica del GMPc en el tejido eréctil y demostrando que el AMPc resulta insuficiente para compensar el déficit en la vía GMPc/PKG in vivo en dichos animales (Hedlund et al., 2000).

**Shear stress:** Otro mecanismo que activa la producción de NO es el *shear stress* o fuerza de cizallamiento que ejerce el flujo sanguíneo sobre el endotelio vascular y de los sinusoides cavernosos produciendo la activación de la vía PI3K/Akt y fosforilación de eNOS causando la liberación de NO y para producir relajación sostenida del músculo liso, y se le considera responsable del mantenimiento de la erección peneana (Joannides et al., 1995; Paniagua et al., 2001; Hurt et al., 2002).

**Factor hiperpolarizante derivado del endotelio:** En células endoteliales de arterias peneanas pequeñas, a diferencia del endotelio de los cuerpos cavernosos, existe una relajación residual no mediada por NOS ni por COX, que se asocia a un factor todavía desconocido, el al que se llamó *factor hiperpolarizante derivado del endotelio* (EDHF). En la circulación sistémica existe una correlación entre el tamaño del vaso y la contribución del NO en la relajación dependiente del endotelio. Este compuesto relajante presente en el endotelio de las arterias peneanas es resistente al bloqueo de NOS y de COX, y su acción vasodilatadora fue inhibida por el incremento de  $K^+$  extracelular y por combinación de bloqueantes de los canales de  $K^+$  activados por  $Ca^{2+}$  ( $K_{Ca}$ ) de media y baja conductancia, atribuyéndose a la liberación de EDHF (Prieto et al., 1998; Angulo et al., 2003). El EDHF actúa produciendo una hiperpolarización de las células endoteliales que se transmite a las células del músculo liso a través de las uniones *gap* mioendoteliales. La identidad de este compuesto aún no está clara.

**Prostanoides relajantes:** En el proceso de erección también intervienen prostanoides relajantes sintetizados tanto en las células endoteliales como musculares, como  $PGE_1$ ,  $PGE_2$  en el músculo liso y  $PGI_2$  en el endotelio. Existen estudios que demuestran la implicación de las prostaglandinas en el mantenimiento del tono arterial peneano en diferentes especies (Minhas et al., 2000; Sánchez et al., 2010) y del hombre (Moreland et al., 2001). La  $PGE_1$  induce

relajación mediada por la vía del AMPc, independiente del endotelio y del NO en arterias peneanas de caballo (Ruiz Rubio et al., 2004).

**Vía de la adenilato ciclasa/AMPc:** Numerosos factores como la activación de los  $\beta$ -adrenoreceptores, algunos prostanoïdes o VIP, producen la activación de la vía de la adenilato ciclasa, cuyos receptores se acoplan a proteínas G, activando la adenilato ciclasa y los niveles intracelulares de adenosin monofosfato cíclico (AMPc), que media relajación del músculo liso vascular mediante la activación de la proteína cinasa A (PKA) y la subsiguiente disminución de la  $[Ca^{2+}]_i$  o de la sensibilización al  $Ca^{2+}$  (Prieto et al., 1997, 2000). El AMPc es metabolizado por la PDE-4, localizada en el músculo liso de arterias peneanas y del cuerpo cavernoso, y su inhibición produce potentes relajaciones de las arterias peneanas, por impedir la metabolización de AMPc (Ruiz Rubio et al., 2004). Además se ha demostrado que la vía del GMPc y la del AMPc están estrechamente relacionadas en el tejido eréctil peneano (Ruiz Rubio et al., 2004), poniendo todo ello de manifiesto la importancia de esta vía durante los procesos de erección.

#### 4.1.1.2. Regulación de la flacidez: factores vasoconstrictores

La flacidez peneana viene determinada por la contracción del músculo liso de las arterias peneanas y de los sinusoides cavernosos, y depende de mecanismos de diversa naturaleza: nerviosos, endocrinos, paracrinós y autocrinos, que se detallan a continuación.

**Inervación simpática:** El músculo liso peneano cuenta con una inervación simpática muy abundante, y los nervios adrenérgicos son responsables del proceso de detumescencia que se produce tras la erección, y además contribuye al mantenimiento del estado de flacidez mediante la liberación de noradrenalina (Giuliano et al., 1993; Prieto, 2008). El estímulo adrenérgico induce la contracción del músculo liso cavernoso así como vasoconstricción de las arterias peneanas, lo que provoca la reducción del flujo arterial de entrada y el colapso de los espacios lagunares, permitiendo así la descompresión de las venas subtúnicas, y con ello el drenaje de los cuerpos cavernosos (Saenz de Tejada et al., 1989; Anderson y Wagner, 1995). La noradrenalina liberada de los nervios actúa sobre los receptores  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  postsinápticos induciendo vasoconstricción, y también sobre los  $\alpha_2$  presinápticos tanto en las terminaciones adrenérgicas, regulando su propia liberación, como en las terminaciones nitrérgicas, regulando la liberación de NO (Hedlund y Andersson, 1985; Simonsen et al., 1997a, 1997b; Recio et al.,



2004). También se ha descrito que los transmisores adrenérgicos pueden inducir vasodilatación en arterias peneanas a través de los  $\beta_2$ -adrenoceptores, facilitando la erección (Anderson y Wagner, 1995; Simonsen et al., 1997a). Además se ha observado que los niveles de adrenalina plasmáticos se encuentran incrementados durante la erección, lo que podría indicar que los  $\beta$ -adrenoceptores incrementan el flujo arterial, lo que se relaciona con el mayor metabolismo y actividad física asociadas a la actividad sexual (Simonsen et al., 2002).

**Neuropéptido Y (NPY):** Este péptido generalmente está localizado con la noradrenalina en los nervios perivasculares simpáticos, y está ampliamente distribuido en el tejido eréctil, especialmente alrededor de las arterias helicinas (Prieto et al., 2004), por lo que se pensó que podría tener un papel importante en la detumescencia. Sin embargo, en humanos no se han observado efectos del NPY ni sobre el cuerpo cavernoso ni sobre las arterias peneanas (Kirkeby et al., 1991; Anderson y Wagner, 1995). Por otra parte la inyección intracavernosa de NPY en conejos incrementó la presión intracavernosa favoreciendo la tumescencia (Kirkeby et al., 1992). Esto se explicó por el doble papel del NPY facilitador/inhibidor sobre la vasoconstricción noradrenérgica en arterias peneanas, mediante una población heterogénea de los receptores del NPY, observándose que los  $Y_1$  e  $Y_2$  postsinápticos incrementan las contracciones a la noradrenalina, mientras que receptores  $Y_2$  presinápticos que inhiben la liberación de noradrenalina (Prieto et al., 2004).

**Prostanoides contráctiles:** A nivel peneano se sintetizan y liberan numerosos prostanoides como la  $PGF_{2\alpha}$ , el  $TXA_2$  o la  $PGE_2$ , involucrados en el mantenimiento del tono miogénico espontáneo (Minhas et al., 2000; Sánchez et al., 2010), y su producción podría estar regulada por la presión parcial de oxígeno (Daley et al., 1996; Azadzi et al., 1992). El bloqueo de la NOS desenmascara la producción de prostanoides contráctiles en el endotelio de las arterias peneanas de caballo (Martínez et al., 2003).

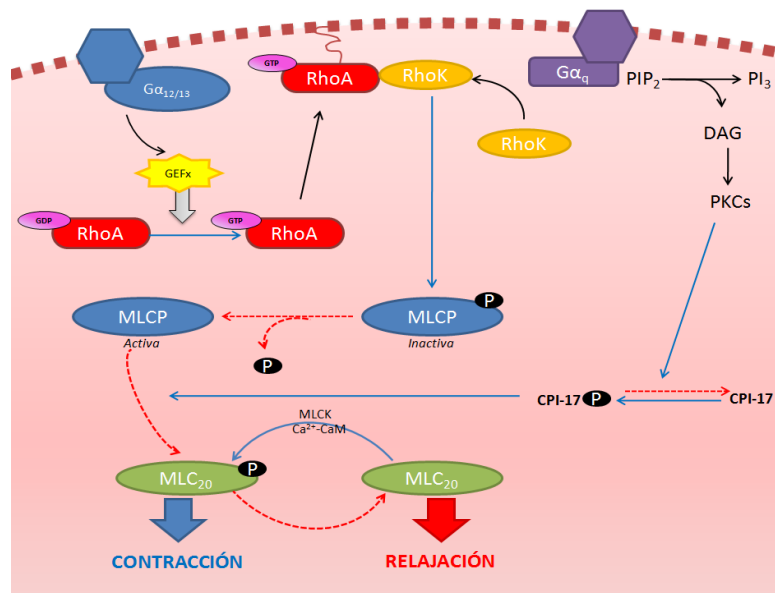
**Angiotensina II (AII):** Es un péptido que se puede formar localmente en el endotelio y en el músculo liso de los cuerpos cavernosos, donde media efectos contráctiles mediante su unión a los receptores  $AT_1$  musculares (Park et al., 1997; Becker et al., 2001). Los niveles plasmáticos de AII se encontraron incrementados durante el proceso de detumescencia (Becker et al., 2001). Además, antagonistas del receptor  $AT_1$  disminuyeron las contracciones producidas por estimulación eléctrica de los cuerpos cavernosos *in vitro* (Kifor et al., 1997). Por estas y otras evidencias, la AII se considera un factor importante involucrado en la iniciación de la detumescencia como consecuencia de un incremento en la actividad simpática. También se han descrito efectos protectores de antagonistas del receptor  $AT_1$  sobre los cambios

estructurales que sufren los vasos peneanos durante la hipertensión, por lo que la AI podría estar relacionada con procesos de remodelado vascular relacionados con el incremento en la presión arterial (Comiter et al., 1997)

**Endotelinas:** Como ya se ha descrito en el apartado 1.2.2.1., las endotelinas son péptidos endógenos con acción vasoconstrictora, sintetizadas en el endotelio vascular. Se ha propuesto que podrían tener un papel en el mantenimiento del tono en el músculo liso del tejido eréctil (Anderson y Wagner, 1995). La ET-1 es un potente vasoconstrictor en diferentes tipos de músculo liso peneano como el cuerpo cavernoso, la arteria cavernosa, la vena dorsal profunda y las venas circunflejas, cuya síntesis puede iniciarse por la trombina, el factor derivado de plaquetas (PDF), la vasopresina, o por efecto de las catecolaminas sobre células endoteliales (Yanagisawa et al., 1988). Sus efectos son mediados por los receptores ET<sub>A</sub>, localizado en el músculo liso y de acción contráctil, y por los receptores ET<sub>B</sub>, localizados en el músculo, con acción vasoconstrictora, y en el endotelio vascular, con acción vasodilatadora (Mills et al., 2001; Böhm y Pernow, 2007). Se han descrito los efectos de la ET-1 en los sinusoides cavernosos donde se localizan receptores ET<sub>A</sub>, ejerciendo acción vasoconstrictora por un incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  de músculo debido a la movilización del IP<sub>3</sub> que actúa sobre los depósitos intracelulares de  $Ca^{2+}$  y por el flujo de  $Ca^{2+}$  a través de la membrana mediante canales de  $Ca^{2+}$  operados por receptor (ROC) y/o canales de  $Ca^{2+}$  operados por voltaje (VOC) (Holmquist et al., 1990, 1992). También se ha descrito la presencia de receptores ET<sub>B</sub> de acción relajante a nivel de los nervios peneanos (Holmquist et al., 1992). La infusión de ET-1 y ET-3 en ratas, induce diferentes efectos vasoactivos según la dosis, así, incrementan la presión intracavernosa a bajas dosis, mientras que la disminuyen a altas concentraciones (Ari et al., 1996). Se considera que la ET-1 regula el tono muscular peneano, y a su vez actúa como modulador de otros agentes contráctiles como noradrenalina (Holmquist et al., 1990) o de la proliferación celular (Zhao y Christ, 1995).

**Procesos de sensibilización al Calcio:** Se considera que la principal causa de la contracción del músculo liso es debida fundamentalmente a la elevación de la  $[Ca^{2+}]_i$ , bien por su entrada desde el exterior de la célula, o por su liberación desde los depósitos intracelulares de  $Ca^{2+}$  (retículo sarcoplásmico), activando la cinasa de las cadenas ligeras de miosina (MLCK), dependiente de  $Ca^{2+}$  y CaM, y consecuente fosforilación de la cadena ligera de miosina (MLC), lo que desencadena el acortamiento de las fibras musculares, y posterior contracción y desarrollo de fuerza (Brozovich, 2003). Sin embargo, numerosos estudios han demostrado que la contracción en el músculo liso es dependiente también de otro mecanismo en el que juega

un papel importante la actividad de la fosfatasa de la cadena ligera de miosina (MLCP). Así, la inhibición de la actividad de MLCP provoca un incremento en la fuerza ante concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  constantes, dando lugar al fenómeno conocido como “sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$ ” de la célula muscular lisa en los que están implicadas las cinasas Rho y/o PKC (Somlyo y Somlyo, 2000). La unión de RhoA activada y RhoK fosforilan a MLCP, impidiendo su actividad y promoviendo así la contracción del músculo liso vascular sin modificaciones en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Así, numerosos agonistas de esta vía, pueden inducir sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$  en las arterias peneanas, facilitando la flacidez, o dificultando la erección. Así, la inhibición de RhoK produce un incremento de la presión intracavernosa y erección por un mecanismo independiente del NO, sin afectar de forma significativa la presión arterial (Chitaley et al., 2001). La actividad fisiológica tónica de la RhoA/RhoK parece regular la función eréctil y el mantenimiento del estado de flacidez del pene. Además, la vía RhoA/RhoK posee un papel en el endotelio vascular regulando negativamente la fosforilación de la enzima eNOS a nivel del residuo Ser<sup>1177</sup> mediante la inhibición de la Akt, y directamente sobre la expresión de eNOS, disminuyendo la producción de NO endotelial (Ming et al., 2002; Shiga et al., 2005). Por todo ello, el antagonismo de RhoK introduce una alternativa terapéutica potencial para el tratamiento de la DE.



**Figura XIII. Regulación de la miosina por la vía RhoA/RhoK.** Las flechas azules-continuas indican las vías que activan la miosina y conducen a la contracción muscular. Las rojas-discontinuas reducen la actividad de la miosina. Diferentes agonistas actúan sobre sus receptores asociados a proteínas G e inician la cascada ilustrada en el esquema de eventos intracelulares que inhibe a la fosfatasa de la cadena ligera de miosina (MLCP), lo que incrementa la actividad de la cinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK), que fosforila a la MLC en el residuo Ser<sup>19</sup> (MLC<sub>20</sub>) y promueve la contracción muscular. PIP<sub>2</sub> (fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato). IP<sub>3</sub> (inositol trifosfato). DAG (diacilglicerol). PKC (proteína cinasa C). RhoK (Rho cinasa). CPI-17 (proteína de 17 kD inhibidora de proteína fosfatasa 1 (PP1) potenciada por la PKC. MLCK (cinasa de las cadenas ligeras de la miosina. GEF (factores intercambiadores de nucleótidos de guanina).

#### 4.2. Disfunción eréctil y enfermedad cardiovascular

La DE es una condición patológica que consiste en la incapacidad para iniciar y/o mantener una erección peneana suficiente para una relación sexual satisfactoria. Es una condición que afecta a más de 150 millones de hombres en todo el mundo, según el consenso de los Institutos de Salud de los EEUU, y se prevee que las cifras se duplicarán en 20 años (Meuleman, 2002). La DE está asociada con efectos adversos en la calidad de vida y, en particular, con el bienestar personal y las interrelaciones familiares y sociales, ya que durante mucho tiempo se ha subestimado su contribución a otras afecciones crónicas de la salud como la depresión (Laumann et al., 1999a, 1999b). Puede tener origen en diversos factores, que a grandes rasgos, se pueden dividir en causas psicógenas y orgánicas. Anteriormente se consideraba a las primeras como las principales, sin embargo, actualmente se ha demostrado que la mayoría de los casos de DE tienen origen orgánico, aunque es común que coexistan ambas causas. Las causas orgánicas incluyen cambios hormonales, alteraciones en la inervación peneana, deterioro del flujo de entrada arterial peneano, disfunción del mecanismo veoclusivo, o degeneración del tono cavernoso. La DE es una alteración predominante en la enfermedad vascular, y así, gran variedad de factores de riesgo vascular, como diabetes, edad, hipercolesterolemia, hipertensión, sedentarismo o tabaquismo, están asociados con el deterioro de la función vascular peneana, y caracterizan la DE vasculogénica. En realidad, la DE se considera una manifestación temprana de disfunción endotelial sistémica y enfermedad cardiovascular (Billups, 2005).

La Organización Mundial de la Salud estima que existen 150 millones de varones en todo el mundo que sufren diabetes, y así mismo, prevé que estos datos se duplicarán para el año 2025. La DE presenta una prevalencia tres veces mayor en varones con diabetes mellitus tipo 1 y 2 que en hombres no diabéticos, desarrollándose en los primeros a una edad más temprana, e incrementando con el desarrollo de la diabetes. Se estima que entre el 50 y el 75% de hombres diabéticos sufren algún grado de DE (Hakim y Goldstein, 1996). Feldman y colaboradores (1994) observaron que la prevalencia de la DE era del 51% en varones con diabetes mellitus tipo 1, y del 37% en pacientes con diabetes mellitus tipo 2, frente a un 25% en pacientes no diabéticos.

El proceso de erección es un fenómeno que requiere la integridad neural, un músculo liso cavernoso viable, y células endoteliales funcionales, ya que todos ellos controlan la producción y liberación de transmisores y mediadores que regulan el equilibrio entre los

estados de erección y flacidez, como se ha descrito en el apartado anterior. Por ello el deterioro de cualquiera de estos tipos celulares puede traducirse en una pérdida de la capacidad eréctil, y son numerosos los factores de riesgo que pueden contribuir al deterioro de la función endotelial peneana, y por tanto, al deterioro de la erección:

*Diabetes mellitus:* Numerosos estudios en tejido cavernoso de animales y humanos diabéticos apuntan a mecanismos multifactoriales como nexo de unión entre la DE y la diabetes, principalmente desórdenes metabólicos como son exceso de ácidos grasos libres o resistencia a la insulina. La DE es una complicación que frecuentemente afecta a varones diabéticos, ya que la hiperglucemia contribuye a trastornos metabólicos que promueven disfunción endotelial y complicaciones vasculares (Brownlee, 2001). Elevados niveles de glucosa inducen la formación de AGEs, que afectan a la función endotelial a través de numerosos mecanismos, alterando el NO liberado por el endotelio peneano, mediante la generación de ROS y afectando la expresión de factores de crecimiento endoteliales (Ganz y Seftel, 2000; Jesmin et al 2003; Nangle et al., 2003; Musicki et al., 2005). Estas alteraciones se traducen en la alteración de la función endotelial y DE. Los AGEs se encuentran en elevadas proporciones en el tejido peneano de pacientes diabéticos e interfieren con la producción de NO endotelial inactivando directamente la fosforilación de eNOS (Musicki et al., 2005). La formación de ROS y el incremento del estrés oxidativo asociado a los AGEs provocan alteraciones de los cuerpos cavernosos, ya que incrementan la peroxidación lipídica, favoreciendo la producción de anión superóxido ( $O_2^-$ ), así como la disminución en los niveles de antioxidantes (Jeremy et al., 2000; Tuncayengin et al., 2003; Bivalacqua et al., 2005). Además, los monocitos circulantes, que se encuentran significativamente incrementados en pacientes con DE, también se encuentran involucrados en la producción de ROS (Morano et al., 2007). El radical libre  $O_2^-$  interfiere con la biodisponibilidad de NO, incrementando la disfunción endotelial, y deteriorando la función vascular peneana en diabéticos de manera crónica (Jones et al., 2002). En pacientes diabéticos con DE, también se ve afectada la vía de señalización de RhoA/RhoK, ya que se ha observado que la proteína vasoconstrictora RhoK tiene incrementada su expresión en el cuerpo cavernoso de pacientes diabéticos, al mismo tiempo que disminuye la actividad de eNOS, contribuyendo a la disfunción endotelial y DE (Bivalacqua et al., 2004). La vasculopatía peneana en diabéticos se encuentra también asociada a la disminución de la expresión del factor de crecimiento endotelial (*vascular endothelial growth factor*, VEGF) en tejido cavernoso, alterando mecanismos intracelulares, lo que produce la disminución en la activación de la eNOS (Jesmin et al., 2003).

*Hipertensión:* Existe una mayor prevalencia de DE en individuos hipertensos que en el resto de población (Jensen et al., 1999). Estudios en modelos animales de hipertensión han sugerido que una presión sanguínea elevada induce cambios morfológicos en el lecho vascular peneano que contribuyen al fallo en la erección (Okabe et al., 1999; Behr-Roussel et al., 2003), y también se ha observado que la hipertensión favorece la formación de radicales libres, que a su vez facilitan los procesos de DE (Jiang et al., 2005).

*Hipercolesterolemia:* La hipercolesterolemia se considera un factor de riesgo independiente para el desarrollo de DE, contribuyendo por sí misma a la alteración del lecho vascular peneano (Feldman et al., 2000). Así, existen estudios que apuntan a la hipercolesterolemia como responsable de una disminución de la reactividad de los cuerpos cavernosos, reduciendo la actividad de la eNOS, y por tanto la biodisponibilidad de NO (Seo et al., 1999; Xie et al., 2007).

*Síndrome Metabólico:* Es una condición altamente prevalente en países industrializados, que se manifiesta como la combinación colectiva de varios factores de riesgo vasculares para la enfermedad cardiovascular y la DE, incluyendo obesidad, hiperglucemia, hipertensión y alteraciones lipídicas. Numerosos estudios han establecido la asociación entre el Síndrome Metabólico y la DE, estando ambas asociadas por una función endotelial anormal (Esposito et al., 2005; Demir et al., 2006). Además, la DE se ve aumentada significativamente al incrementar el número de factores de riesgo cardiovascular concomitantes presentes en cada paciente (Heaton y Adams, 2004; Seftel et al., 2004; Shabbir et al., 2004). Así, la acumulación de factores de riesgo vascular contribuye a la alteración vascular y DE, y se ha demostrado que cada uno de ellos, de forma independiente, están involucrados en la disfunción endotelial, o en un aumento de radicales libres, o disminución en la actividad y/o biodisponibilidad de eNOS y NO respectivamente.

*Envejecimiento:* También se ha establecido que la incidencia de DE aumenta con la edad (Monga, 1999). Se ha descrito la pérdida de función endotelial en los cuerpos cavernosos de personas mayores debido a alteraciones en la disponibilidad de NO, incremento de estrés oxidativo, alteración en la expresión de factores de crecimiento derivados del endotelio, así como incremento en la actividad RhoA/RhoK (Costa y Virag, 2009).

En definitiva, todo estos factores de riesgo cardiovascular, generan alteraciones que se asocian de alguna forma a la disfunción endotelial, que inicialmente refleja la pérdida de

actividad biológica y/o biosíntesis de NO a nivel endotelial, reduciendo así la respuesta vasodilatadora de las células del músculo liso en última instancia.

#### 4.2.1. Relación entre disfunción eréctil y disfunción endotelial

Como se acaba de describir, la DE tiene alta prevalencia en pacientes con enfermedades vasculares como la enfermedad arterial coronaria, enfermedades cerebrovasculares, diabetes o hipertensión arterial. Además existe un incremento del riesgo de padecer eventos cardiovasculares como angina de pecho, infarto de miocardio, o infarto cerebral en pacientes con DE (Montorsi et al., 2003a, 2003b, 2006; Gazarusso et al., 2004; Chew et al., 2008). Desde el punto de vista fisiopatológico, la disfunción endotelial es uno de los nexos entre la DE y la enfermedad cardiovascular, lo cual podría ser explicado en base a que el endotelio posee un papel esencial en la fisiología de la erección (Saenz de Tejada et al., 2004; Prieto et al., 2008), a que la disfunción endotelial con frecuencia subyace a enfermedades vasculares como la enfermedad coronaria (Solomon et al., 2003), y a que la disfunción endotelial sistémica posee una repercusión grande en el desarrollo de la DE, y aunque no afecta únicamente al pene, al ser éste un órgano altamente irrigado, resulta enormemente afectado (Mazo et al., 2006).

Por tanto, los factores que asocian la DE y la disfunción endotelial podrían ser cualquiera que produzca un desequilibrio entre los factores relajantes y contráctiles, como son defectos en la expresión y/o actividad de eNOS, incremento en el estrés oxidativo, o disminución en los factores relajantes independientes de NO, o modificaciones en la producción o acción de algunas hormonas, factores de crecimiento y citoquinas; así como el incremento en la producción y/o actividad de compuestos vasoconstrictores. Estos mecanismos no son excluyentes, sino que pueden producirse múltiples alteraciones de forma simultánea, y se detallan a continuación.

##### 4.2.1.1. *Alteraciones de la NOS*

En pacientes diabéticos con DE, la falta de relajación del tejido cavernoso se asocia principalmente a la carencia en la biodisponibilidad de NO, lo cual puede suceder por varias causas.

Existen evidencias científicas que demuestran la disminución de la expresión de la eNOS en el tejido eréctil de animales diabéticos (Akingba y Burnett, 2001; Bivalacqua et al., 2004), así como la mejora de la expresión mediante la transferencia genética de la enzima mediada por adenovirus en penes de ratas diabéticas (Bivalacqua et al., 2005). Sin embargo otros estudios no han encontrado modificaciones en la expresión de la enzima a nivel peneano (Escrig et al., 2002; Li et al., 2002; Musicki et al., 2005; Villalba et al., 2009), por lo que la información sobre las variaciones de la expresión de eNOS en el pene durante la DE es controvertida.

Otra causa de la disminución de la actividad de eNOS puede ser la carencia del sustrato L-arginina, y se ha demostrado que la administración oral del mismo a ratas y conejos diabéticos, mejora la relajación del tejido cavernoso (Yildirim, 1999; Gür et al., 2000), y se ha propuesto que elevados niveles de lipoproteínas de baja densidad (LDL) oxidadas, podrían ser la causa de la carencia en la captación de L-arginina (Posch et al., 1999). La carencia de cofactores de la eNOS también podría ser causa de su inactivación o menor actividad. La tetrahydropterina ( $BH_4$ ) es un cofactor que facilita la dimerización de la NOS, la transferencia de electrones desde el dominio reductasa al dominio oxigenasa de la enzima, la unión al sustrato L-arginina y el mantenimiento del grupo prostático hemo en su forma redox activa (Vásquez-Vivar, 1998). La disminución en la biodisponibilidad de  $BH_4$ , o la carencia de sustrato L-arginina podrían impedir la dimerización de la enzima, necesaria para su actividad normal, lo que da lugar a que la eNOS catalice la producción de anión superóxido en lugar de NO, fenómeno conocido como desacoplamiento de la eNOS (Musicki et al., 2008).

La fosforilación de la eNOS en el residuo Ser<sup>1177</sup> juega un papel indispensable en la erección, ya que mientras que la nNOS inicia la erección en respuesta al estímulo sexual, la vía de la PI3K/Akt/eNOS (Ser<sup>1177</sup>) es la encargada del mantenimiento de la misma (Burnett et al., 1992; Hurt et al., 2002; Prieto, 2008), por lo que cualquier alteración en la vía se traduce en una alteración de la actividad de la eNOS. Se ha descrito que los niveles elevados de glucosa producen la formación N-acetilglucosaminas con la eNOS a través de la vía de las hexosaminas, dificultando su fosforilación en la Ser<sup>1177</sup> en respuesta al estímulo del *shear stress*, lo que se asocia a una disminución de la capacidad eréctil (Musicki et al., 2005).



#### 4.2.1.2. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo consiste en el desequilibrio entre la producción y eliminación de ROS, y juega un papel esencial en el desarrollo de disfunción endotelial asociada a desórdenes vasculares (diabetes, envejecimiento, hipertensión, hipercolesterolemia). Existen evidencias científicas suficientes para afirmar que los radicales libres están involucrados en el desarrollo de disfunción endotelial peneana durante la diabetes. Se ha visto que en el tejido peneano de ratas diabéticas existen niveles muy elevados de anión superóxido y de malonilaldehído, un producto de la peroxidación lipídica, comparados con tejido de animales no diabéticos (Ryu et al., 2003; Bivalacqua et al., 2005). Aunque no se sabe cómo, el incremento de ROS observado en el lecho vascular peneano de animales diabéticos, podría estar relacionado con la actividad de la vía de las MAPK (Nangle et al., 2006). Además, el descenso de los niveles plasmáticos y/o tisulares de las defensas antioxidantes como las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa, glutatión peroxidasa (GSH) y el ácido ascórbico tienen un papel fundamental en la patogénesis de la DE. La producción de ROS causa daño tisular y disfunción endotelial alterando las relajaciones dependientes del endotelio por la oxidación del NO a peroxinitrito, lo que conlleva la activación del NF $\kappa$ B, el cual inicia una respuesta inflamatoria en la pared vascular y la producción de diferentes moléculas de adhesión. Además el peroxinitrito puede actuar como factor contráctil (Enderman y Schffrin, 2004), incrementando la contractilidad del tejido eréctil y contribuyendo así a la DE.

La interacción entre el NO y las especies reactivas de oxígeno es uno de los mecanismos más importantes implicados en la fisiopatología de la DE (Jones et al., 2002). La producción incrementada de ROS reduce la biodisponibilidad del NO, produciendo a largo plazo daño endotelial y un descenso de la relajación del músculo liso arterial y trabecular del pene, siendo ésta una de las principales causas de DE. Además, la acumulación de radicales libres y la lesión endotelial causada por los mismos juegan un papel importante durante el proceso de envejecimiento (Ames et al., 1993; Ferrara et al., 1995)

#### 4.2.1.3. Otros factores derivados del endotelio independientes de NO

Como se ha descrito anteriormente, en el endotelio de las células peneanas se liberan otros factores relajantes como PGI<sub>2</sub> o EDHF, cuya alteración bien puede contribuir a la disfunción endotelial que causa la DE en individuos diabéticos. La prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) produce

relajación dependiente de la vía del AMPc, y se ha observado que el peróxido puede disminuir su producción, así como incrementar la liberación de prostanoïdes contráctiles como TxA<sub>2</sub> o PGH<sub>2</sub> (Jeremy et al., 1986; Zou et al., 1997; Sullivan et al., 1998). Sánchez y colaboradores (2010) estudiaron el metabolismo del ácido aráquidónico por la COX-1 y la COX-2 en arterias peneanas de ratas prediabéticas, y observaron una disminución de prostanoïdes relajantes bajo condiciones de resistencia a la insulina, así como el incremento de los contráctiles, lo que contribuye a la disfunción endotelial peneana.

La relajación endotelial inducida por EDHF también se ha visto afectada en distintos lechos vasculares de modelos diabéticos tipo 1 y 2 (Angulo et al., 2003; Bryan et al., 2005), lo que sugiere que estas alteraciones en pequeñas arterias de resistencia como las del lecho peneano, podrían contribuir significativamente a las complicaciones microvasculares asociadas a la diabetes. Sin embargo, los mecanismo subyacentes a estos desórdenes en la liberación de prostanoïdes y EDHF en el pene durante procesos diabéticos, aún no están claros.

#### 4.2.1.4. *Vía de RhoA/RhoK: sensibilización al Calcio*

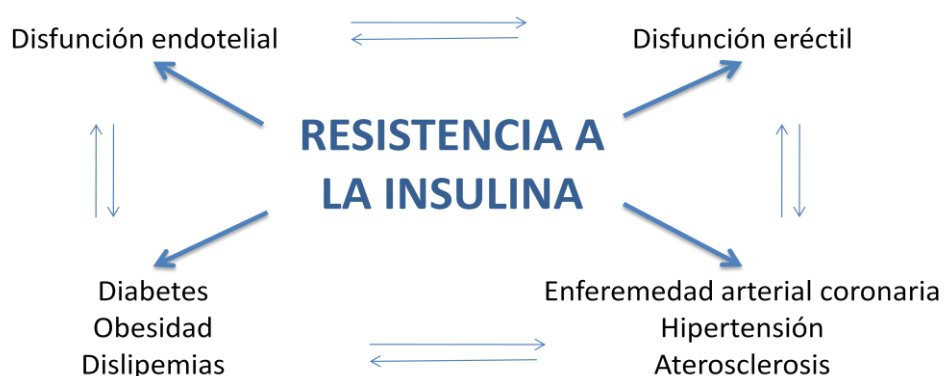
La patogénesis de la DE diabética se asocia también al incremento en la contractilidad del tejido eréctil. La vía de RhoA/RhoK es responsable del incremento del tono vascular peneano independientemente de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. Se ha descrito que durante el proceso de erección esta vía se encuentra inhibida por el NO (Mills, 2002), ya que la activación de PKG dependiente de GMPc que intervienen en la vasodilatación inducida por NO, también antagoniza la vía de RhoA/RhoK en el músculo liso cavernoso (Sauzeau et al., 2003). A su vez, Bivalacqua y colaboradores (2004) demostraron la existencia de un mecanismo de regulación a la baja de la eNOS mediado por la activación de la vía RhoA/RhoK en el pene de ratas diabéticas, de tal forma que la inhibición de la vía RhoA/RhoK mejora el contenido de la proteína eNOS y su actividad, restaurando la función eréctil durante la diabetes. Se ha observado también, aunque en otros lechos vasculares, que las especies reactivas de oxígeno activan la vía de RhoA/RhoK (Jin et al., 2004). Además RhoK estimula a la enzima NAD(P)H oxidasa, lo que incrementa la producción de ROS (Higashi et al., 2003), favoreciendo la disfunción endotelial. En el músculo liso peneano de animales diabéticos se ha observado un incremento en la expresión de RhoA y RhoK (Chang et al., 2003). Villalba y colaboradores (2011) han observado además que los procesos de sensibilización al Ca<sup>2+</sup>, en las arterias peneanas de animales prediabéticos, son dependientes del tipo receptor contráctil, y así, la contracción inducida por fenilefrina, un

agonista de los  $\alpha$ -adrenoceptores, sufre procesos de sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$  mediados por RhoK durante el Síndrome Metabólico; mientras que para el agonista de los receptores de  $\text{TxA}_2$  la contracción es dependiente de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ . Todos estos datos sugieren que en el pene de individuos diabéticos, la vía RhoA/RhoK se encuentra regulada a la alta, alterando la vasodilatación peneana, lo que podría contribuir al desarrollo de DE.

#### **4.3. Disfunción eréctil y resistencia a la insulina**

Como ya se ha descrito, la DE es una complicación cardiovascular cuya patogénesis multifactorial incluye componentes neurológicos, psicógenos, endocrinos y vasculares. Desde un punto de vista puramente mecánico, la erección es básicamente un evento vascular que requiere una función endotelial intacta. Por ello la DE puede ser considerada como una manifestación clínica de la disfunción endotelial que afecta a la región de la vasculatura peneana (Potenza y Montagnani, 2008).

A pesar de que la disfunción endotelial es considerada un primer marcador del deterioro vascular, inicialmente es asintomática, y antes que las complicaciones vasculares se manifiesten, se producen numerosos cambios en las estructuras vasculares. Sin embargo, la disfunción endotelial puede ser evidente cuando es necesaria la relajación mediada por el endotelio para ejercer un efecto específico como sucede en el proceso eréctil. Por ello la DE podría ser una primera expresión de disfunción endotelial, y por ello se considera un centinela indicador de la enfermedad arterial coronaria silente (Montorsi et al., 2003a, 2003b; Solomon et al., 2003; Rodriguez et al., 2005). La resistencia a la insulina provoca disfunción endotelial, y la disfunción endotelial se manifiesta como DE mucho antes que la enfermedad arterial coronaria u otras complicaciones vasculares clínicamente evidentes.



**Figura XIV. Resistencia a la insulina en los desórdenes metabólicos y cardiovasculares.** La resistencia a la insulina es un denominador común de alteraciones metabólicas como diabetes, obesidad y dislipemias, que se asocian frecuentemente a desórdenes hemodinámicos incluidos aterosclerosis, hipertensión y enfermedad arterial coronaria. La resistencia a la insulina contribuye directamente a la disfunción endotelial, que precede a cambios estructurales más profundos y a complicaciones cardiovasculares clínicamente evidentes. La DE es uno de los síntomas en pacientes con resistencia a la insulina, y un centinela de eventos cardiovasculares como la enfermedad arterial coronaria (*Adaptación de Potenza y Montagnani, 2008*).

Debido al diámetro pequeño de las arterias cavernosas y al alto contenido de endotelio con respecto a la estructura total de los vasos, el lecho vascular peneano podría ser un indicador sensitivo de la enfermedad vascular sistémica cuando se compara con otras zonas vasculares (Billups et al., 2005). Por ello, la DE se asocia proporcionalmente a la presencia y grado de aterosclerosis asintomática en varias zonas, incluyendo las arterias coronarias, y podría preceder al desarrollo de la enfermedad arterial coronaria clínicamente evidente con bastante antelación (Chiurlia et al., 2005; Montorsi et al., 2003b, 2006). La disfunción endotelial es la clave en la fisiopatología de la DE vascular. Por ello, todos los mecanismos descritos previamente para la disfunción endotelial bajo condiciones de resistencia a insulina, pueden afectar también a las arterias cavernosas.

A pesar de que hay numerosos estudios que documentan los efectos de la hiperglucemia y la diabetes sobre la función eréctil, son pocos los que han estudiado la influencia directa de la insulina sobre la vasculatura peneana. De forma interesante, en las células del músculo liso cavernoso en humanos se expresa de manera constitutiva la enzima NOS dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (Anfosi et al., 2002), por lo que estas células no son sólo dianas de acción de NO endotelial o terminaciones nerviosas, sino que también son una fuente potencial de NO involucrado en los mecanismos de erección. En células musculares de tejido cavernoso humanas en cultivo, la insulina activa esta isoforma constitutiva de la NOS, incrementando las concentraciones intracelulares de nucleótidos cíclicos vasodilatadores, GMPc y AMPc, a través

de la activación de la vía de señalización de PI3K (Anfosi et al., 2002). Sin embargo, la co-estimulación con insulina y péptido C, secretados en las células  $\beta$  pancreáticas conjuntamente, incrementa la expresión de iNOS y eNOS de una manera dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (Li et al., 2004a). Los inositol-fosfoglicanos (IPGs) generados a partir de lípidos y/o precursores de proteínas en respuesta a la insulina, han mostrado efectos similares a la insulina *in vivo* e *in vitro* (Huang et al., 1999). En el cuerpo cavernoso de conejos, el tratamiento con inositol fue capaz de incrementar las relajaciones inducidas por ACh y estimulación eléctrica mediante el aumento de NO (Nascimento et al., 2006). Los efectos vasodilatadores de la insulina han sido demostrados también en cuerpo cavernoso de conejo asociados a la inhibición de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L mediante la producción de prostaciclina (Myung et al., 2006). Finalmente en ratas de edad avanzada, el tratamiento con factor de crecimiento insulínico (IGF)-1 mejora la función eréctil restaurando la activación de las vías NO-GMPc (Pu et al., 2008). Todo ello sugiere que la insulina juega un papel importante dentro de los complejos mecanismos que regulan la erección peneana, ya que favorece la producción de NO y consecuente vasodilatación.

En base a estas observaciones, la resistencia a la insulina y la hiperinsulinemia asociada podrían afectar directa e indirectamente a los componentes celulares y tejidos del plexo vascular cavernoso causando DE temprana. Algunas estrategias farmacológicas y no farmacológicas para el tratamiento de la resistencia a la insulina podrían mejorar o limitar la progresión de DE en pacientes con Síndrome Metabólico.

#### 4.3.1. Disfunción eréctil y obesidad

Diversos estudios epidemiológicos sugieren que un estilo de vida saludable y la delgadez están asociados con un menor riesgo de padecer DE. Así, los varones con un índice de masa corporal superior a 28.7 corren un riesgo un 30% mayor de desarrollar DE que aquellos con un índice de masa corporal normal (menor o igual a 25) (Bacon et al., 2003). Otros estudios también aportan datos indicativos de una mayor prevalencia de impotencia sexual en hombres obesos (Chung et al., 1999; Pinnock et al., 1999). El estudio *Massachusetts Male Aging* realizado en una población de 10000 varones del área de Boston (Massachusetts) durante 9 años (Feldman et al., 2000) señaló que la prevalencia de la DE era de un 51% en aquellos varones que padecían diabetes tipo 1 y de un 37% en aquellos con diabetes tipo 2,

frente al 24.8% en pacientes no diabéticos. Por otra parte, estudio de Fung y colaboradores (2004), en el que se realizó un estudio retrospectivo de los 25 años anteriores, puso de manifiesto que el sobrepeso es un factor de riesgo independiente para la DE. En general, los sujetos con DE suelen ser más pesados y con un diámetro de cintura mayor que los sujetos sin DE, y además, entre ellos existe un alto porcentaje de individuos hipertensos e hipercolesterolémicos (Esposito et al., 2006).

Sin embargo, a pesar de la relación existente entre la obesidad y la DE, puede no ser tan evidente, y algunos estudios sugieren la implicación de la adiposidad central como un regulador esencial de la inflamación y de la función endotelial (Esposito y Giugliano, 2004). La resistencia a la insulina, la disfunción endotelial y la inflamación subclínica son factores presentes en la población obesa y podrían contribuir al incremento de riesgo cardiovascular demostrado en los obesos (Esposito et al., 2003). El endotelio vascular juega un papel esencial en la patogénesis de numerosos desórdenes trombóticos e inflamatorios, y por ello la disfunción endotelial es un predictor de futuros eventos coronarios, y podría ser detectada clínicamente por la determinación plasmática de los niveles circulantes de algunos marcadores solubles (Bonetti et al., 2003). Los pacientes con DE sufren alteraciones vasculares similares a los sujetos con aterosclerosis (Cheitlin, 2004), por lo que la DE podría ser un marcador centinela de la enfermedad arterial coronaria asintomática (Blumentals et al., 2004). Así, Giugliano y colaboradores evaluaron la asociación entre la función eréctil, la función endotelial y los marcadores de inflamación vascular sistémica en 80 hombres obesos de entre 35 y 55 años, y demostraron índices alterados de la función endotelial, así como concentraciones elevadas de citoquinas proinflamatorias, con respecto a individuos no obesos (Giugliano et al., 2004).

#### 4.3.2. Disfunción eréctil y Síndrome Metabólico

El Síndrome Metabólico se caracteriza por ser un compendio de factores de riesgo asociados a la resistencia a la insulina y a la obesidad abdominal, y al incremento de la enfermedad arterial coronaria y de la mortalidad por enfermedad cardiovascular. Las alteraciones metabólicas y cardiovasculares que incluyen este síndrome son obesidad central, resistencia a la insulina, hipertensión y dislipemias, las cuales constituyen también factores de riesgo independientes para la DE (Esposito et al., 2008).

Burchardt y colaboradores (2000) realizaron una encuesta entre 104 pacientes hipertensos de los cuales el 68,3 % declararon algún grado de DE. En otro estudio llevado a cabo entre 7689 pacientes, de los que 3906 fueron hipertensos y no diabéticos, se demostró DE en un 67 % de los individuos. Del total 2377 pacientes fueron hipertensos y diabéticos, mostrando DE el 77 % de ellos (Giuliano et al., 2004). Estos datos dejan claro que un número significativo de pacientes hipertensos padecen algún tipo de impotencia sexual (Jackson et al., 2010). Por otra parte, se ha demostrado que la hiperlipidemia incrementa el riesgo de padecer DE por 1.8 veces cuando se tienen altos niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDL) protectoras. Por cada incremento en los niveles de colesterol de 1 mmol/L, se incrementa 1.32 veces el riesgo de desarrollar DE. Por cada incremento de HDL de 1mmol/L disminuye esta posibilidad del orden de 0.38 veces (Solomon et al., 2006). Está demostrado también que los individuos diabéticos poseen una prevalencia de DE del 80 % en pacientes mayores de 60 años, cuyo origen es tanto endotelial, como neurológico. Es posible que el control temprano de los niveles de glucosa pueda prevenir estos datos (Desouza et al., 2002).

También ha sido estudiada ampliamente la hipótesis de que la DE es más prevalente en hombres con Síndrome Metabólico. En un estudio prospectivo realizado en EEUU sin controles sanos, el 43 % de los varones que presentaron DE mostraron Síndrome Metabólico (Bansal et al., 2005), y en otro estudio realizado frente a controles sanos, el 26.7 % de los pacientes con Síndrome Metabólico padecían DE frente al 13 % de los controles (Esposito et al., 2005). Así, al incrementar los componentes del Síndrome Metabólico, también lo hace la presencia de DE orgánica. Se ha observado también que la incidencia de hipogonadismo está triplicada en caso de Síndrome Metabólico, por lo que se ha propuesto una fuerte asociación entre ambos, que podría tratarse con terapia de testosterona (Makhsida et al., 2005).

Estudios realizados en ratones con diabetes tipo 2 indicaron que la función eréctil estaba significativamente disminuida frente a animales sanos, por alteración tanto de los mecanismos venooclusivos como del aporte sanguíneo arterial a los cuerpos cavernosos penenanos, cuya cantidad de colágeno además estaba disminuida (Luttrell et al., 2008). El grupo de Wingard y colaboradores, evaluaron en el 2007 la función eréctil en la rata Zucker obesa, un modelo experimental de Síndrome Metabólico y resistencia a la insulina, mediante la estimulación del nervio cavernoso, demostrando por primera vez la alteración de la respuesta eréctil en este modelo animal (Wingard et al., 2007).

En definitiva, la DE es común en pacientes con afecciones cardiovasculares ya que comparten los factores de riesgo causales que tienen un impacto negativo sobre la función endotelial. Por ello la impotencia sexual es un aviso temprano de la enfermedad vascular y coronaria silente, y podría ser utilizada como diagnóstico cuando no existen aún síntomas cardíacos.







## **II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



La enfermedad arterial coronaria y la DE son complicaciones cardiovasculares frecuentes en pacientes con diabetes mellitus tipo 2, obesidad y dislipidemias, alteraciones metabólicas todas ellas asociadas con resistencia a la insulina y disfunción endotelial (Cerosimo y De Fronzo, 2006).

La DE orgánica tiene una prevalencia tres veces mayor en varones con diabetes mellitus tipo 1 y 2 que en hombres no diabéticos. Se estima que entre el 50 y el 75% de hombres diabéticos sufren algún grado de DE (Hakim y Goldstein, 1996), y la prevalencia es del 51% en varones con diabetes mellitus tipo 1, y del 37% en pacientes con diabetes mellitus tipo 2, frente a un 25% en pacientes no diabéticos (Feldman et al., 1994).

A pesar de que la disfunción endotelial es considerada un primer marcador del deterioro vascular, inicialmente es asintomática desde un punto de vista clínico, y antes de que las complicaciones vasculares se manifiesten se producen numerosos cambios en las estructuras vasculares. Sin embargo, la disfunción endotelial puede ser evidente cuando es necesaria la relajación mediada por el endotelio para ejercer un efecto específico como sucede en el proceso de erección. Por ello la DE podría ser una primera expresión de disfunción endotelial, y es considerada como una señal temprana de enfermedad vascular subclínica, siendo una condición altamente prevalente en pacientes con factores de riesgo cardiovascular como hipertensión, dislipemias, obesidad central y resistencia a la insulina (Montorsi et al., 2003a, 2003b). El conjunto de estas anormalidades metabólicas y cardiovasculares, conocidas como Síndrome Metabólico o prediabético, a menudo incrementa el riesgo de DE (Fonseca y Jawa, 2005; Jackson, 2006) y de enfermedad arterial coronaria y fallo cardíaco (Alexander et al., 2003). En este sentido, la DE y la enfermedad arterial coronaria comparten los mismos factores de riesgo y coexisten frecuentemente, siendo considerada la primera un marcador de enfermedad coronaria silente ya que se manifiesta antes desde el punto de vista clínico (Montorsi et al., 2003b; Gazarusso et al., 2004; Jackson et al., 2010). Por todo ello, la DE y la enfermedad arterial coronaria pueden ser dos manifestaciones distintas de una misma enfermedad, siendo la disfunción endotelial un nexo común entre ambos desórdenes cardiovasculares (Montorsi et al., 2005) aunque los mecanismos subyacentes a este nexo de unión aún no se conocen con exactitud.

La resistencia a la insulina se define como la disminución de la sensibilidad de las acciones metabólicas de la insulina que promueven la captación de glucosa. Sin embargo,

además de las acciones metabólicas clásicas, la insulina posee acciones vasculares destinadas a acoplar la homeostasis metabólica y hemodinámica bajo condiciones fisiológicas (Kim et al., 2006). Existen evidencias experimentales que demuestran que la disfunción endotelial, junto con la menor sensibilidad a las acciones de la insulina en el endotelio vascular, contribuyen al fenotipo de los estados de resistencia a la insulina por deteriorar la capacidad de la hormona para modificar el flujo sanguíneo y promover la captación de sustratos (Baron et al., 1991; Steinberg et al., 1996; Kim et al., 2006, 2008).

La unión de la insulina a su receptor en el endotelio vascular activa la vía de la PI3K/Akt que fosforila la eNOS en la Ser<sup>1177</sup> facilitando así la liberación de NO y la consecuente vasodilatación (Zeng et al., 2000). Esta vía regula también la translocación del transportador de glucosa GLUT-4 hacia la bicapa lipídica facilitando la captación de glucosa por las células y acoplando así las acciones metabólicas y vasculares de la insulina (Kim et al., 2006). La unión de la insulina a su receptor endotelial puede activar además la vía de señalización de las cinasas MAP, que se asocia con la expresión de genes, crecimiento celular y producción de endotelina (ET)-1, un potente vasoconstrictor liberado del endotelio vascular (Cardillo et al., 1999). Se ha observado que en estados de obesidad/resistencia a insulina y en pacientes con diabetes mellitus tipo 2, se encuentra deteriorada de forma selectiva la vía PI3K/Akt/eNOS mientras que la vía de las MAPK no está alterada, o incluso está incrementada (Jiang et al., 1999; Cusi et al., 2000). Además, la vasodilatación en respuesta a la insulina está deteriorada en diferentes lechos arteriales de modelos animales experimentales con resistencia a la insulina, como son las arteriolas del músculo esquelético, debido a la alteración en la liberación de NO a través de la vía PI3K/eNOS (Eringa et al., 2007), y esta vía se encuentra también regulada a la baja disminuyendo así la biodisponibilidad de NO y la función endotelial en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (Okon et al., 2005).

Son muchos los factores implicados en el deterioro de las vías de señalización intracelular de la insulina que contribuyen al desarrollo de la resistencia a la insulina, así la constante exposición de la vasculatura a elevados niveles de ácidos grasos (AGL) circulantes, obesidad y diabetes mellitus tipo 2, pueden causar simultáneamente resistencia a la insulina en los tejidos y disfunción endotelial en el tejido vascular (Dresner et al., 1999; Steinberg et al., 2000b; Belfort et al., 2005; Kim et al., 2006). Estudios iniciales in vivo han demostrado que la elevación de AGL deteriora tanto la captación de glucosa como la producción de NO y vasodilatación mediados por insulina en el músculo esquelético en el hombre (Steinberg et al., 2000b).

La disfunción endotelial es a menudo referida como una situación de menor biodisponibilidad de factores relajantes derivados del endotelio, principalmente de NO, donde la capacidad vasodilatadora del endotelio se encuentra disminuida. Sin embargo, otra alteración importante en la disfunción endotelial es el incremento de la producción y actividad biológica de factores contráctiles como la ET-1, especialmente en los casos de resistencia vascular a la insulina, en los que se ha descrito que el deterioro de la vía vasodilatadora de la Akt/eNOS está alterada amplificando así los efectos vasoconstrictores y proaterogénicos de la ET-1, como consecuencia de una hiperactivación de la vía de las cinasas MAP (Böhm y Pernow, 2007). Las acciones de la ET-1 sobre las arterias coronarias de ratas *Zucker* obesas han sido previamente caracterizadas, demostrándose un mecanismo de compensación mediante una mayor producción de NO mediada por receptores ET<sub>B</sub> con el fin de evitar un exceso en las acciones vasoconstrictoras/proaterogénicas de la hormona (Katakam et al., 2005). Sin embargo, no se conocen las posibles alteraciones de las acciones de la ET-1 en el lecho vascular peneano en estados prediabéticos.

Por otra parte, evidencias recientes demuestran que las arterias coronarias se adaptan a los cambios hemodinámicos en los estados de resistencia a la insulina como diabetes y obesidad preservando y/o regulando a la alta los mecanismos celulares intrínsecos a la pared vascular (Szerafin et al., 2006; Villalba et al., 2009; Sánchez et al., 2010). Por el contrario en el lecho vascular peneano, se produce disfunción endotelial y alteraciones marcadas en la estructura vascular durante el Síndrome Metabólico y prediabetes que llevan a la disfunción eréctil (Wingard et al., 2007; Villalba et al., 2009; Sánchez et al., 2010). La resistencia a la insulina y la hiperinsulinemia asociadas son importantes factores de riesgo tanto para la enfermedad arterial coronaria como para la DE orgánica, sin embargo, su influencia sobre las acciones vasculares de la insulina en la circulación coronaria y peneana no se conocen.

Por todo lo expuesto, en la presente Tesis Doctoral se llevó a cabo el estudio comparado de las acciones vasculares de la insulina en los lechos arteriales peneano y coronario y las posibles alteraciones de las vías de señalización de la hormona en un modelo experimental de Síndrome Metabólico/resistencia a la insulina.

Los objetivos específicos del trabajo fueron:

1. Determinar las acciones vasculares de la insulina en las arterias coronarias de la rata *Zucker* y caracterizar las vías de señalización implicadas.
2. Evaluar los mecanismos involucrados en las posibles alteraciones de las acciones vasoactivas de la insulina en las arterias coronarias en un modelo experimental de resistencia a Insulina, y concretamente determinar la implicación de los ácidos grasos saturados.
3. Determinar las acciones vasculares de la insulina en las arterias peneanas de la rata *Zucker*, y caracterizar las vías de señalización implicadas.
4. Evaluar los mecanismos subyacentes a las posibles alteraciones de las acciones vasoactivas de la insulina en las arterias peneanas de un modelo experimental de resistencia a insulina.
5. Caracterizar los mecanismos implicados en las acciones vasculares de la ET-1 en las arterias peneanas de la rata *Zucker*, así como las posibles alteraciones existentes en estados prediabéticos.
6. Establecer la contribución de los mecanismos de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y sus movimientos intracelulares a las acciones vasculares de la insulina y de la ET-1 en las arterias peneanas, y sus posibles alteraciones en estados de resistencia a la insulina.



### **III. MATERIAL Y MÉTODOS**





## 1. MATERIAL

### 1.1. Material biológico

El manejo de los animales del presente estudio se llevó a cabo de acuerdo con la legislación vigente sobre protección de animales de experimentación y otros fines científicos (R.D. 1201/2005). Los protocolos experimentales correspondientes fueron aprobados por el Comité de Experimentación Animal de la Universidad Complutense de Madrid.

En el presente estudio se ha empleado la rata *Zucker* obesa (RZO) como modelo animal de síndrome metabólico y la rata *Zucker lean* (RZL) como control sano. Las RZO son animales que sufren una mutación del gen que codifica el receptor de leptina, perdiendo así el estímulo de saciedad y simulando un estado de ayuno permanente, por lo que se alimentan descontroladamente desarrollando obesidad y síndrome metabólico. Se utilizaron animales macho que fueron suministrados por *Charles River Laboratories S.A. (Barcelona, España)*. Una vez adquiridos, con 7-11 semanas de edad, se mantuvieron estabulados en condiciones controladas de temperatura y luz, en el animalario del departamento de Fisiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, donde fueron alimentados con pienso y agua *ad libitum* hasta el momento de su sacrificio, con 17-18 semanas de edad.

El mismo día del experimento los animales fueron pesados y se recogieron muestras de sangre para la posterior determinación en el plasma de los niveles de glucosa, colesterol total y triglicéridos mediante *kits* comerciales. Los niveles de insulina plasmática fueron valorados por ELISA.

## 1.2. Material de laboratorio

### 1.2.1. Instrumentación general

Los aparatos utilizados para la preparación de soluciones y medios fisiológicos se enumeran a continuación:

- Balanza de precisión Sartorius.
- Agitadores magnéticos.
- pHmetro Crison.
- Sistema de filtración Mili-Q (Millipore<sup>TM</sup>).
- Termostato de inmersión B. Braun, modelo Thermomix 1420.

### 1.2.2. Equipamiento para el registro de la tensión isométrica de las micropreparaciones arteriales

- Miógrafos microvasculares dobles de 10 ml de capacidad con temperatura regulada y con dos transductores de fuerza isométricos (*Danish Myo Techonology, Dinamarca*), lo que permitió examinar dos segmentos arteriales al mismo tiempo, uno de RZL y otro de RZO.
- Polígrafos Houston de dos canales para el registro analógico de la fuerza ejercida por las arterias en tiempo real.
- Powerlab, software informático para el registro digital de la fuerza en tiempo real.
- Microscopio estereoscópico Leica.
- Fuente de luz fría Leica, para la disección y montaje de las preparaciones arteriales.

### 1.2.3. Equipamiento para el registro simultáneo de la concentración intracelular de $\text{Ca}^{2+}$ [ $\text{Ca}^{2+}$ ]<sub>i</sub> y de la tensión isométrica en micropreparaciones arteriales

- Monocromador DeltaRAM X (Photon Technology International) utilizado para excitar a dos longitudes de onda las arterias, a 340 nm y a 380nm.
- Sistema de detección fotomultiplicador 814 (Photon Technology International).
- Lámpara UV de Xenon LPS-220B (Photon Technology International).
- Miógrafo microvascular simple de 8 ml de capacidad con temperatura regulada y con dos transductores de fuerza isométricos (*Danish Myo Techonology, Dinamarca*). Sólo permite montar un segmento arterial, por lo que se montaron RZL y RZO en días consecutivos, siendo alternados entre sí los segmentos de primer y segundo día de montaje.
- Microscopio de fluorescencia invertido Zeiss, Axiovert S100 T (Photon Technology International), sobre el que se colocó el miógrafo para el enfoque del segmento arterial. Se utilizó un objetivo para fluorescencia Olympus LUCPlanFLN 20x.

### 1.2.4. Equipamiento para la identificación de proteínas por Western Blotting

- Placas de 96 pocillos para la lectura de absorbancia.
- Lector de absorbancia colorimétrica.
- Centrífuga.
- Geles de poliacrilamida NuPAGE® 4-12% Bis-Tris-Gel (Invitrogen).
- Cubetas y generador de campo para la separación proteica por electroforesis (Invitrogen).
- Cubetas, sandwicheras perforadas y generador de campo ortogonal, para la transferencia proteica desde el gel a una membrana (Bio-Rad, Gran Bretaña).
- Agitadores con distintas velocidades para las cubetas de Western Blotting.

### 1.3. Reactivos

Para la realización de los experimentos se utilizaron los siguientes compuestos y reactivos:

- Insulina de páncreas bovino (Sigma Aldrich, España).
- ET-1 humana/porcina, potente vasoconstrictor peptídico endógeno (Tocris, USA).
- Acetilcolina (ACh) clorato (Sigma Aldrich, España).
- L-Fenilefrina (Phe) hidrocloreto (Sigma Aldrich, España).
- 5-hidroxi-triptamina (5-HT) clorato (Sigma Aldrich, España).
- N<sup>ω</sup>-Nitro-L-Arginina (L-NNA), inhibidor de NOS (Sigma Aldrich, España).
- LY-294002 hidrocloreto, inhibidor selectivo de PI3K (Tocris, USA).
- PD-98059, inhibidor específico de MAPKK/MEK (Tocris, USA).
- Indometacina, inhibidor no selectivo de ciclooxigenasa (Sigma Aldrich, España).
- Bosentán, antagonista no selectivo de los receptores de endotelina ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub> (F.Hoffmann-La Roche, Suiza).
- BQ-788 sal de sodio, antagonista selectivo del receptor ET<sub>B</sub> (Tocris, USA).
- BQ-123, antagonista selectivo del receptor ET<sub>A</sub> (Tocris, USA).
- BQ-182874, antagonista selectivo competitivo y no peptídico del receptor ET<sub>A</sub> (Tocris, USA).
- Guanetidina sulfato, neurotoxina adrenérgica (Sigma Aldrich, España).
- Ácido palmítico puro, ácido graso saturado (Sigma Aldrich, España).
- (±) Isoproterenol hidrocloreto, agonista general de receptores β- adrenérgicos (Sigma Aldrich, España).
- Forskolina, activador de la adenilato ciclasa (Sigma Aldrich, España).
- Pluronic<sup>®</sup> F-127 low UV (Invitrogen, Gran Bretaña).
- Cremophor EL<sup>®</sup> (Biochemika, Fluka).
- Fura-2 AM, marcador fluorescente de unión al Ca<sup>2+</sup> (Invitrogen, Gran Bretaña).
- Ionomicina sal de calcio, ionóforo del calcio (Invitrogen, Gran Bretaña).
- Manganeso (II) Cloruro 4-hidrato (MnCl<sub>2</sub> · 4 H<sub>2</sub>O) (PRS, Panreac, España).
- EGTA (Ácido etilenglicol bis(2-aminoetiléter) N,N,N',N' tetra-acético) (Sigma Aldrich, España).
- HEPES sal de sodio (Sigma Aldrich, España).

- SDS 2X Solución al 20% (Euromedex, Francia).
- Ortovanadato sódico, inhibidor de fosfatasas (Calbiochem, Alemania).
- Tris HCl, Trizma<sup>®</sup> Base, 99,9% tritacion (Sigma Aldrich, España).
- Cocktel inhibidor de proteasas (Roche, España).
- Reactivos A, B y C, Dc Protein Assay Reagents (Bio-Rad, Gran Bretaña).
- Tampón de carga, NuPAGE<sup>®</sup> LDS Sample Buffer (4X) (Invitrogen, Gran Bretaña).
- Patrón molecular, Precision Plus Protein<sup>™</sup> Kaleidoscope<sup>™</sup> Standards (Bio-Rad, Gran Bretaña).
- Metanol (Thermo Fisher Scientific, USA).
- Glicina (Thermo Fisher Scientific, USA).
- Rojo Ponceau S, solución al 0,1 % (p/v) en 5 % (v/v) de ácido acético (Sigma Aldrich, España).
- Tween 20 (Euromedex, Francia).
- Luminol (Sta Cruz Biotechnology, USA).
- Femtol (Thermo Fisher Scientific, USA).

#### 1.4. Soluciones

Todos las soluciones se prepararon con sales inorgánicas Merck de grado analítico, disueltas en agua desionizada de alta pureza (Mili-Q).

##### 1.4.1. Soluciones fisiológicas

###### 1.4.1.1. *Solución salina fisiológica (PSS)*

La composición de la solución salina fisiológica (PSS) utilizada fue la siguiente (en mM):

– Cloruro sódico (NaCl)	119.00
– Bicarbonato sódico (NaHCO <sub>3</sub> )	25.00
– Cloruro potásico (KCl)	4.60
– Fosfato monopotásico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	1.40
– Cloruro magnésico (MgCl <sub>2</sub> )	1.20

– Cloruro cálcico ( $\text{CaCl}_2$ )	1.50
– Ácido etilén diamino tetraacético (EDTA)	0.027
– Glucosa ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ )	11.00

La solución de PSS se preparó a diario diluyendo los reactivos en agua destilada y en continua agitación. Previamente a la adicción de  $\text{CaCl}_2$  se dejó oxigenar la solución durante 20 minutos con carbógeno (95%  $\text{O}_2$  – 5%  $\text{CO}_2$ ) con el fin de optimizar el pH de la misma a 7.4. La adicción de EDTA tuvo como objetivo retrasar la oxidación e impedir el crecimiento bacteriano en la solución.

#### 1.4.1.2. Solución salina fisiológica rica en potasio (KPSS)

En esta solución se sustituyeron cantidades equimolares de NaCl por KCl con respecto a la solución PSS normal. La solución salina fisiológica rica en potasio (KPSS) se preparó también a diario, y su composición fue la siguiente (en mM):

– Cloruro potásico (KCl)	119.00
– Bicarbonato sódico ( $\text{NaHCO}_3$ )	25.00
– Glucosa ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ )	11.00
– Fosfato monopotásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	1.40
– Cloruro magnésico ( $\text{MgCl}_2$ )	1.20
– Cloruro cálcico ( $\text{CaCl}_2$ )	1.50
– Ácido etilén diamino tetraacético (EDTA)	0.027

Los reactivos se diluyeron conjuntamente en agua desionizada y en agitación, para después oxigenar con carbógeno durante 20 minutos y finalmente añadir el  $\text{CaCl}_2$ .

#### 1.4.1.3. Solución salina fisiológica libre de $\text{Ca}^{2+}$

Durante el montaje de las arterias dorsales peneanas, y para evitar la vasoconstricción de las mismas, se utilizó una solución salina fisiológica libre de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{PSS}^0$ ), que se preparó sustituyendo el  $\text{CaCl}_2$  por 0.1 mM de EGTA ( $\text{PSS}_{0.1}^0$ ), un compuesto quelante del calcio.

### 1.4.2. Soluciones de calibración para los experimentos de FURA-2:

#### 1.4.2.1. $K^+ - Hepes^0_2$

Ajustando el pH a 7.45, su composición en mM es:

– Cloruro potásico (KCl)	144.6
– Cloruro magnésico ( $MgCl_2$ )	1.2
– HEPES	5.0
– Glucosa ( $C_6H_{12}O_6$ )	6.1
– EGTA	2.0

#### 1.4.2.2. $K^+ - Hepes^5$

Ajustando el pH a 7.45, su composición en mM es:

– Cloruro potásico (KCl)	144.6
– Cloruro magnésico ( $MgCl_2$ )	1.2
– Cloruro cálcico ( $CaCl_2$ )	5.0
– HEPES	5.0
– Glucosa ( $C_6H_{12}O_6$ )	6.1

### 1.4.3. Tampones utilizados en Western Blotting

#### 1.4.3.1. *Tampón de lisis para la extracción de proteínas*

– SDS	1%
– Ortovanadato de sodio	1 mM
– Tris HCl	10 mM
– Antiproteasa	



*1.4.3.2. Solución tampón para la electroforesis*

- Solución 20X NuPAGE® de Invitrogen 25 ml

Ajustando a un volumen final de 500 ml con agua desionizada

*1.4.3.3. Tampón de transferencia 10X*

- Tris base (250 mM) 30 g
- Glicina (1920 mM) 144g
- SDS 20% (0,1% final) – 500 µl SDS 5 ml

Ajustando a un volumen final de 1 litro con agua desionizada

*1.4.3.4. Tampón de transferencia 1X:*

- Tampón de transferencia 10X 100 ml
- Metanol (20%) 200 ml

Ajustando a un volumen final de 1 litro con agua desionizada

*1.4.3.5. TBS-T 10X:*

- Tris base (200 mM) 24.2 g
- NaCl (615 mM) 80 g
- Agua desionizada 800 ml
- Ajustar el pH a 7,8
- Twen 20 (1%) 10 ml

Ajustando a un volumen final de 1 litro con agua desionizada

1.4.3.6. *TBS-T 1X:*

- TBS-T 10X 100 ml

Ajustando a un volumen final de 1 litro con agua desionizada

1.4.3.7. *Solución de strip*

- Glicina (2 M) 150 g
- Agua desionizada 800 ml
- Ajustar pH a 2,2
- Tween 20 (1%) 10 ml
- SDS 20% (1% final) 50 ml

Ajustando a un volumen final de 1 litro con agua desionizada

1.4.3. Soluciones para los estudios morfológicos1.4.3.1. *Tampón fosfato salino (PBS)*

Ajustando el pH a 7.4, su composición en concentraciones mM es:

- NaCl 137.0
- KCl 2.6
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8.1

## 2. MÉTODOS

### 2.1. Metodología para los estudios funcionales

#### 2.1.1. Estudio de la reactividad arterial

##### 2.1.1.1. Preparación y disección de las arterias

Para la realización de los experimentos se utilizaron arterias peneanas y coronarias de ratas Zucker macho de entre 17 y 18 semanas de edad, que fueron sacrificadas por dislocación cervical y posterior exanguinación. El pene y el corazón se extrajeron de la rata recién sacrificada y se mantuvieron en PSS a 4-8 °C para la inmediata disección de las arterias dorsales peneanas y la arteria coronaria descendente izquierda, con ayuda de un microscopio estereoscópico y una fuente de luz fría, retirando el tejido conjuntivo, adiposo (pene) y miocardio circundante (corazón) que rodea a estas arterias con la ayuda de pinzas y tijeras de microdisección utilizadas habitualmente en cirugía oftálmica, obteniendo segmentos arteriales de segundo y tercer orden de aproximadamente 2 mm de longitud.

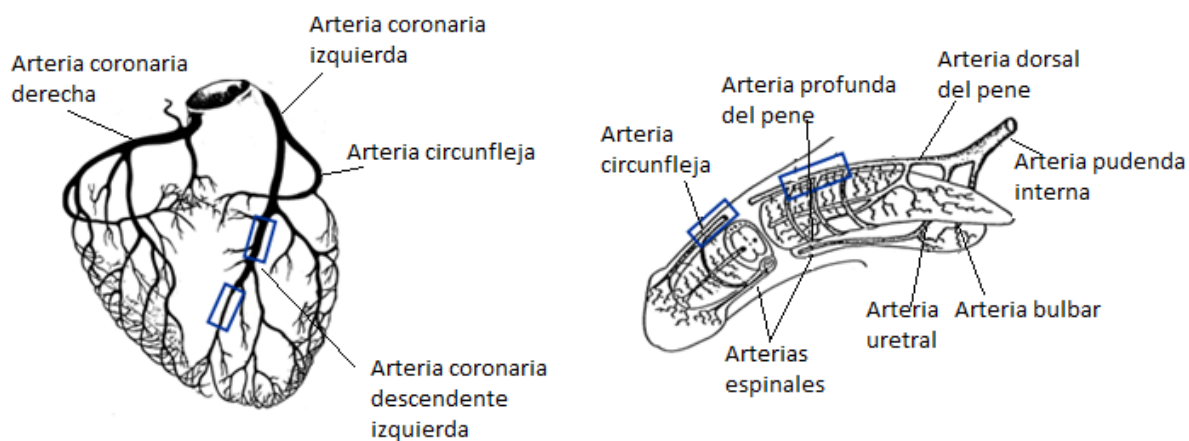
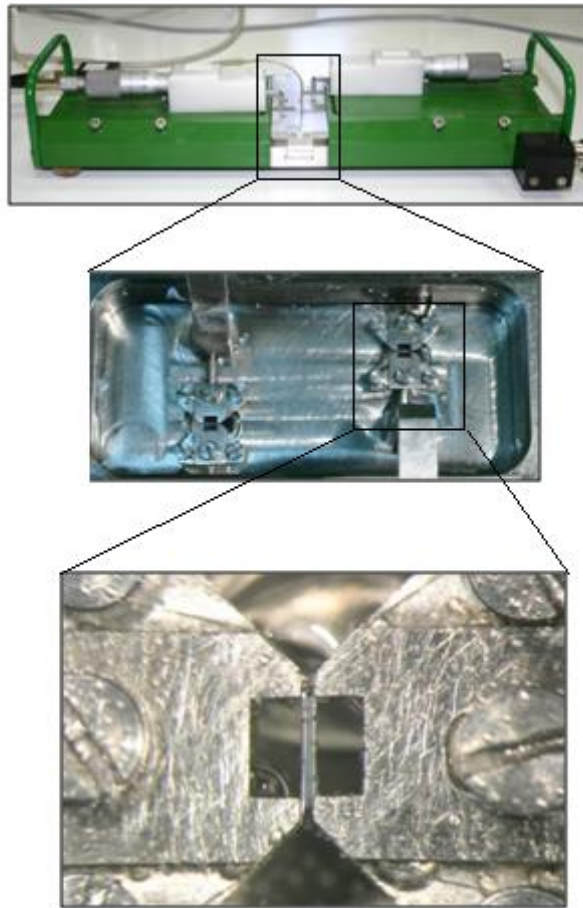


Figura XV. Esquema representativo de los segmentos arteriales de la arteria coronaria descendente izquierda (izquierda) y de la arteria dorsal peneana (derecha), de segundo y tercer orden, utilizadas en los experimentos.

### 2.1.1.2. Montaje de las arterias en el miógrafo

Las ramas de segundo y tercer orden, tanto de la arteria dorsal peneana, como de la arteria coronaria descendente izquierda de RZL y RZO fueron montadas en paralelo en miógrafos microvasculares dobles insertando dos alambres de tungsteno de 40  $\mu\text{m}$  de diámetro a través de la luz vascular, anclando los extremos de los mismos a unos tornillos. El miógrafo consta de dos canales para el montaje de segmentos arteriales, y cada uno de ellos se encuentra conectado, por un lado a un transductor de fuerza isométrico, que registra los cambios de tensión en las arterias, y por otro, a un tornillo micrométrico que regula la separación entre los alambres que atraviesan el segmento arterial (Mulvany y Halpern, 1977).



**Figura XVI. Miógrafo microvascular doble y detalle del montaje de una arteria peneana.**

### 2.1.1.3. Normalización de las arterias

Una vez montados en el miógrafo los segmentos arteriales, se mantuvieron en PSS a una temperatura de 37 °C y fueron aireadas con carbógeno (95% O<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub>) para mantener un pH de 7.4. Tras la estabilización de 30 minutos, se aplicó un diámetro óptimo de trabajo ( $I_1$ ) para cada preparación. Para ello se calculó la relación existente entre la tensión de reposo de la pared vascular y la circunferencia interna del vaso para calcular la circunferencia interna ( $L_{100}$ ) correspondiente a una presión transmural de 100 mm de Hg para un vaso relajado *in situ*. A continuación, para cada segmento, se movió el tornillo micrométrico hasta aplicar una circunferencia interna  $L_1$ , siendo  $L_1=0.9 \times L_{100}$ , circunferencia a la cual el desarrollo de la fuerza es máximo. El cálculo del diámetro luminal interno efectivo se determinó como  $I_1=L_1/\pi$  (Mulvany y Halpern, 1977).

### 2.1.2. Determinación del calcio intracelular por ratio-fluorometría

#### 2.1.2.1. Introducción a la fluorescencia

La medida de la concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular ( $[Ca^{2+}]_i$ ) mediante el empleo de sondas fluorescentes ha sido el método más extendido para los estudios de la sensibilización al Ca<sup>2+</sup> y la entrada dinámica de Ca<sup>2+</sup> a través de la membrana en el músculo liso vascular (Himpens y Casteels, 1987). La sonda fluorescente fura-2 fue introducida como indicador de la  $[Ca^{2+}]_i$  con numerosos aspectos mejorados comparando con otros indicadores que ya habían sido usados previamente tales como quin2 (Grynkievick et al., 1985). En la molécula de fura-2, cuatro grupos carboxilo proporcionan el sitio de unión al Ca<sup>2+</sup> y un grupo derivado del estilbeno le confiere sus propiedades fluorescentes. Así, el fura-2 es una molécula hidrofílica que se une al Ca<sup>2+</sup> de forma específica pero en su forma acetoximetil éster (fura-2 AM) se convierte en una molécula hidrofóbica capaz de atravesar sin dificultad las membranas biológicas. Una vez ésta se localiza en el citosol, las esterasas citosólicas romperán los enlaces éster liberando su forma ácido, la cual debido a su carácter hidrofílico queda atrapada en el interior celular pudiendo unirse al Ca<sup>2+</sup> libre para formar el complejo fura-Ca<sup>2+</sup>. En cualquier caso, la molécula de fura-2 muestra propiedades fluorescentes tanto en su forma libre como unida al Ca<sup>2+</sup>, pero es en esta forma cuando su fluorescencia incrementa hasta dos veces y su espectro de excitación se desplaza a longitudes de onda menores (en el rango de 362 a 335

nm). La excitación fluorescente de este complejo da lugar a una emisión fluorescente cuyo máximo se sitúa a 510 nm.

Este desplazamiento en la longitud de onda se mide como ratio entre la emisión a una longitud de onda de excitación a 340 nm ( $F_{340}$ ) y a 380 nm ( $F_{380}$ ). El ratio ( $R = F_{340}/F_{380}$ ) se relaciona con la  $[Ca^{2+}]_i$  por la siguiente ecuación (Grynkiewicz et al., 1985):

$$[Ca^{2+}] = K_d \cdot \frac{R - R_{\min}}{R_{\max} - R} \cdot \frac{F_{380 \max}}{F_{380 \min}}$$

Donde  $K_d$  es la constante de disociación del complejo fura-2/ $Ca^{2+}$ ;  $R_{\min}$  y  $R_{\max}$  son el ratio mínimo (ausencia de  $Ca^{2+}$ ) y el ratio máximo (saturación de  $Ca^{2+}$ ), respectivamente;  $F_{380 \max}$  y  $F_{380 \min}$  son la emisión máxima (ausencia de  $Ca^{2+}$ ) y emisión mínima (saturación de  $Ca^{2+}$ ) con excitación a 380 nm.

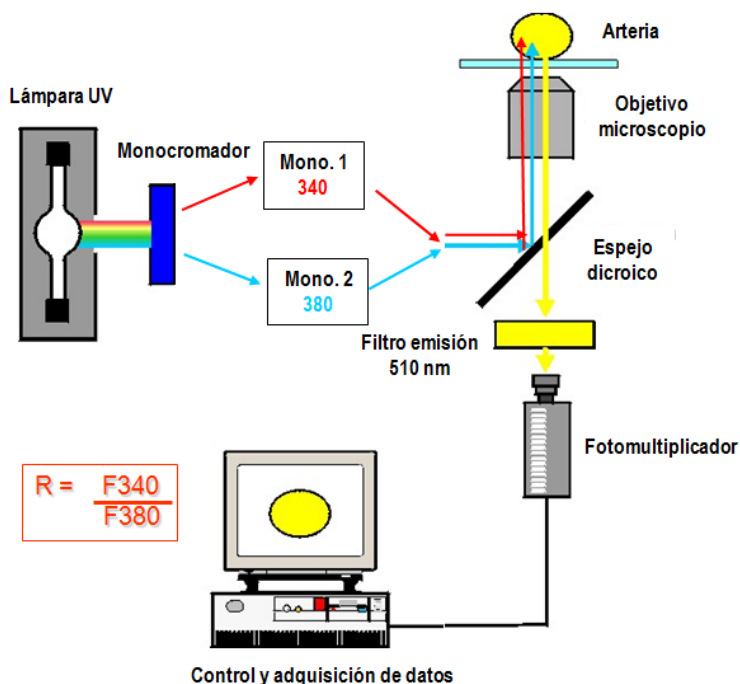
#### 2.1.2.2. Medidas simultáneas de la $[Ca^{2+}]_i$ y la tensión isométrica

Las medidas simultáneas de  $[Ca^{2+}]_i$  y tensión llevadas a cabo en este estudio fueron realizadas en arterias peneanas montadas en un miógrafo simple como se describe en el apartado 2.1.1.2. y de acuerdo con la técnica inicialmente descrita para arterias de resistencia mesentéricas por Jensen et al. (1992). El protocolo de “cargado” con fura-2 en las arterias peneanas se realizó incubando las preparaciones arteriales con fura-2 AM (8  $\mu$ M) durante 3 horas a 37 °C en la oscuridad, lavando 3 veces en PSS después de una hora y media (Villalba, 2007).

El miógrafo se colocó sobre la pletina de un microscopio invertido Zeiss Axiovert S100, donde la preparación fue iluminada de forma alterna con dos longitudes de onda diferentes, 340 y 380 nm a una frecuencia de 10 Hz. La selección de estas longitudes de onda corresponde a los máximos de los registros de fluorescencia de soluciones de fura-2 saturadas de  $Ca^{2+}$  (340 nm) y de fura-2 libre de  $Ca^{2+}$  (380 nm). El haz de luz monocromada se conduce desde una rueda de filtros hasta el microscopio con una guía líquida. La luz es reflejada hacia el objetivo mediante un espejo dicróico que transmite las longitudes de onda superiores a 430 nm y refleja las longitudes de onda inferiores. De este modo, sólo alcanzan la muestra la luz de 340 y 380 nm, mientras que la luz fluorescente emitida por el fura-2 en el rango de 500 a 530 nm atraviesa el espejo dicróico y es conducida al fotomultiplicador pasando a través de un filtro

interferencial de paso de banda centrado en 510 nm. La fluorescencia de emisión a las dos longitudes de onda ( $F_{340}$  y  $F_{380}$ ) y la fuerza (mN) son registradas simultáneamente mediante el software *Felix* (Photon Technology International, USA). Los valores indicados anteriormente ( $R_{\min}$ ,  $R_{\max}$ ,  $F_{380-\max}$  y  $F_{380-\min}$ ) se determinaron mediante un método que compromete la viabilidad de la preparación y que por lo tanto se realiza al final de cada protocolo experimental. Las condiciones de  $\text{Ca}^{2+}$  mínimas y de saturación se realizaron mediante la incubación de la preparación con el ionóforo ionomicina en una solución con EGTA ( $\text{K}^+$ -Hepes<sub>2</sub><sup>0</sup>) y con una solución rica en  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{K}^+$ -Hepes<sup>5</sup>), respectivamente (ver composición en apartado 1.4.2.). Finalmente, la contribución de la fluorescencia no específica se determinó mediante “*quenching*” del fura-2 con  $\text{Mn}^{2+}$  cuyos valores obtenidos fueron sustraídos de todas las medidas obtenidas durante el experimento.

Los registros que se muestran en este trabajo corresponden a la relación o ratio entre la fluorescencia a 340 y 380 nm ( $F_{340}/F_{380}$ ) en función del tiempo, expresados bien como valores absolutos, o bien como porcentaje de las señales máximas de calcio en cada arteria inducidas por una solución rica en  $\text{K}^+$  (KPSS).



**Figura XVII. Esquema representativo del sistema de microfluorimetría.** La luz de excitación proviene de una lámpara ultravioleta pasando por un monocromador que selecciona las longitudes de onda a 340 y a 380 nm, que llegan al microscopio a través de una guía líquida, se refleja en un espejo dicróico centrado en 430 nm y alcanza la preparación a través del objetivo del microscopio. La luz fluorescente emitida por el fura-2 intracelular es capturada por el objetivo, atravesando el espejo dicróico (> 430 nm) y dirigiéndose hasta el filtro de emisión centrado en 510 nm hasta el fotómetro. La señales emitida por la muestra a 510 nm, debidas a la excitación de la misma a 340 nm (fura-2 unido a  $\text{Ca}^{2+}$ ) y a 380 nm (fura-2 libre) son recogidas para el cálculo del ratio  $R = F_{340}/F_{380}$ , como indicador del calcio intracelular.

### 2.1.3. Protocolos experimentales para los estudios funcionales

El día del sacrificio del animal se realizaron experimentos de reactividad vascular con las arterias coronarias intramiocárdicas, mientras que las arterias peneanas se montaron el segundo día después del sacrificio del animal, ya que se ha observado que su reactividad no se ve modificada pasadas 24 horas, manteniéndolas en PSS a 4 °C hasta su uso.

En cada miógrafo microvascular doble se montaron de forma paralela un segmento arterial de RZL y otro de RZO para evaluar conjuntamente su funcionalidad. Una vez montados y normalizados los segmentos arteriales se procedió a comprobar la integridad de la pared muscular así como su capacidad contráctil, mediante dos adicciones consecutivas de KPSS al baño del miógrafo, de 3 minutos de duración cada una, y espaciadas 10 minutos para permitir la relajación del vaso.

La integridad funcional del endotelio vascular fue puesta de manifiesto al adicionar una dosis de acetilcolina (ACh) de 10  $\mu$ M a cada segmento vascular previamente contraído con fenilefrina (Phe, 1  $\mu$ M), en el caso de las arterias penenanas, y con serotonina (5-HT, 20  $\mu$ M) en el caso de las arterias coronarias.

#### 2.1.3.1. *Protocolos para el estudio de las acciones vasculares de la insulina en arterias peneanas y coronarias*

Con el objeto de caracterizar las acciones vasculares de la insulina y las vías de señalización a través de las cuales la hormona ejerce su acción en los lechos vasculares peneano y coronario, así como las posibles alteraciones bajo condiciones de síndrome metabólico se realizaron los siguientes protocolos experimentales en arterias de RZL y RZO:

- En las arterias peneanas se realizaron curvas concentración respuesta (CCR) de insulina en dosis logarítmicas crecientes ( $10^{-11}$  M,  $10^{-10}$  M,  $10^{-9}$  M,  $10^{-8}$  M y  $10^{-7}$  M) en arterias previamente precontraídas durante 10 minutos con Phe.
- En las arterias coronarias, sin embargo, se adicionó una dosis de insulina de 0.1  $\mu$ M en arterias previamente precontraídas con 5-HT.

La insulina presentó taquifilaxis en una segunda CCR, por lo que se utilizaron dos segmentos arteriales distintos, el primero como control, y el segundo fue sometido a



diferentes antagonistas/inhibidores de las enzimas implicadas en las vías de señalización intracelular activadas por la hormona, manteniéndose en el baño del miógrafo durante los 30 minutos previos al protocolo con la hormona. La participación del NO se determinó realizando el protocolo de insulina en presencia de N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina (L-NNA), un inhibidor selectivo de la NOS (100  $\mu$ M). La implicación de la vía de PI3K/Akt fue determinada con LY-294002 (3  $\mu$ M), un inhibidor selectivo de PI3K, mientras que para valorar la implicación de la vía de las MAPK se utilizó el inhibidor de la ERK MAPK, PD-98059 (5  $\mu$ M). La posible implicación de los prostanoïdes se evaluó con indometacina (1  $\mu$ M), un inhibidor no selectivo de la enzima ciclooxigenasa (COX). La participación de la ET-1 se determinó aplicando bosentán (10  $\mu$ M) un antagonista no selectivo de los receptores de endotelina ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub>.

Con el objetivo de evaluar el papel del endotelio vascular en la respuesta inducida por la insulina en las arterias penenanas y coronarias de RZL y RZO, se retiró previamente el endotelio de manera mecánica mediante la fricción de la luz vascular con un cabello humano en el caso de las arterias penenanas (diámetro 100-150  $\mu$ m), y de caballo, por su mayor diámetro, para las arterias coronarias (diámetro 200-300  $\mu$ m), realizando ligeros movimientos hacia delante y hacia atrás. Posteriormente, se comprobó la viabilidad de las preparaciones estimulándolas con KPSS durante 3 minutos. La ausencia de endotelio funcional se comprobó por la falta de relajación ante a una dosis única del agonista endotelial ACh (10<sup>-5</sup> M), en arterias precontraídas con Phe en el caso de las arterias penenanas, y 5-HT las arterias coronarias.

Debido a la participación del endotelio y de la vía del PI3K/Akt/eNOS en la respuesta relajante de los  $\beta$ -adrenoceptores, también se realizaron CCR para el agonista  $\beta$ -adrenérgico isoproterenol en concentraciones semilogarítmicas crecientes (10<sup>-8</sup> M - 3x10<sup>-6</sup> M) en arterias coronarias y penenanas de animales sanos y obesos, tanto en presencia como en ausencia del inhibidor de PI3K LY-294002 (3  $\mu$ M). Así mismo, se realizaron CCR de forskolina (10<sup>-8</sup> M-10<sup>-6</sup> M), un activador de la vía de la adenilato ciclasa/AMP con el fin de determinar las posibles alteraciones en dicha vía bajo condiciones de síndrome metabólico.

#### *2.1.3.2. Protocolos para el estudio de las acciones vasculares de la ET-1 en arterias penenanas*

Las acciones vasculares de la ET-1 y sus receptores, así como las posibles alteraciones bajo condiciones de síndrome metabólico, se caracterizaron en las arterias penenanas. Para ello se realizaron CCR de ET-1 en dosis semilogarítmicas crecientes (10<sup>-11</sup> M -

$10^{-7}$  M), tanto en presencia como en ausencia de los distintos antagonistas selectivos de sus receptores.

Se utilizaron como antagonistas del receptor  $ET_A$  el BQ-123 (1  $\mu$ M) y el BMS-18287 (1  $\mu$ M), mientras que como antagonista del receptor  $ET_B$  se usó el BQ-788 (1  $\mu$ M), ambos mantenidos en el baño del miógrafo durante los 30 minutos previos a la realización de la CCR de ET-1. La ET-1 también presentó taquifilaxis en una segunda CCR por lo que se utilizaron dos segmentos arteriales, uno como control, y otro como tratado.

Para determinar un posible efecto de la ET-1 sobre receptores en nervios de la pared se denervaron químicamente los nervios adrenérgicos utilizando guanetidina (1  $\mu$ M) que se mantuvo en el baño del miógrafo durante 45 minutos antes de realizar CCR de ET-1, renovando el tratamiento cada 15 minutos, y la L-NNA (100  $\mu$ M) para bloquear la NOS y la actividad de los nervios nitrérgicos.

#### 2.1.3.3. *Protocolos para el estudio del efecto de la insulina y la ET-1 sobre las variaciones de $[Ca^{2+}]_i$*

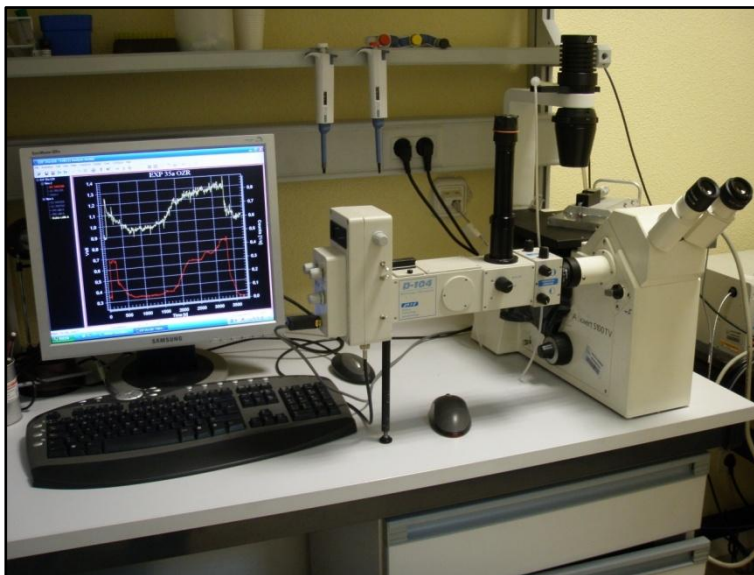
Utilizando el set-up del calcio explicado en el apartado 2.1.2. se realizaron distintos protocolos en las arterias dorsales penenanas de la rata *Zucker*. Las arterias fueron inicialmente estimuladas con KPPS para comprobar la contractilidad de la arteria, así como de la entrada de calcio al citosol por la activación de canales *tipo L* mediante despolarización.

Se estudiaron las variaciones del  $[Ca^{2+}]_i$  inducidas por la insulina (0.1  $\mu$ M) en arterias penenanas de RZL y RZO precontraídas con Phe (1  $\mu$ M), así como la respuesta al agonista endotelial ACh (10  $\mu$ M).

También se determinaron las variaciones  $[Ca^{2+}]_i$  inducidas por ET-1 en arterias penenanas de RZL y RZO, realizando CCR en dosis semilogarítmicas crecientes ( $10^{-11}$  M- $10^{-7}$  M).

Además se realizaron las mismas determinaciones sobre las variaciones de la  $[Ca^{2+}]_i$  y tensión inducidas por el agonista de los receptores de tromboxano, el U-46619, realizando CCR en dosis semilogarítmicas crecientes ( $10^{-9}$  M- $3 \times 10^{-7}$  M) sobre las arterias penenanas de RZL y de RZO.

Tras cada experimento individualmente se realizó el protocolo de calibración para restar las señales de fluorescencia inespecíficas no debidas a los movimientos de calcio (explicado en el apartado 2.1.2.2.).



**Figura XVIII.** *Set –up* para el registro simultáneo de la concentración de calcio intracelular y la tensión isométrica de la arteria.

## **2.2. Estudios para determinación de proteínas por Western Blotting**

### **2.2.1. Disección y estimulación de las arterias**

Se realizaron estudios bioquímicos de Western Blotting para la determinación de las proteínas implicadas en las vías de señalización de la insulina comparativamente en las arterias coronarias de animales sanos y prediabéticos. Para ello se disecó cuidadosamente la arteria coronaria descendente izquierda y sus ramas del miocardio de RZL y RZO, tras lo cual se mantuvieron en PSS a 37 °C y gaseadas con carbógeno (95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>).

Los ensayos de Western blotting se realizaron en arterias coronarias de RZL y RZO bajo tres condiciones diferentes:

- Arterias sin estimular, para el estudio de la actividad/expresión de las proteínas objeto de estudio en condiciones basales.
- Arterias estimuladas con insulina (0.1  $\mu\text{M}$ ) durante 20 minutos, con el fin de observar las variaciones en la actividad y expresión de las proteínas implicadas en las vías de señalización de la hormona.
- Arterias estimuladas con insulina (0.1  $\mu\text{M}$ ) durante 20 minutos tras la incubación con un tratamiento agudo de ácido palmítico en dosis suprafisiológicas (500  $\mu\text{M}$ ) durante 2 horas, para el estudio del efecto de los ácidos grasos saturados sobre arterias coronarias estimuladas con insulina.

Posteriormente las arterias fueron rápidamente congeladas en nitrógeno líquido hasta el momento de su homogenización.

### 2.2.2. Homogenización

La homogenización se realizó manualmente en el mismo tubo *ependorf* donde fue recogida la muestra, manteniéndola sumergida en nitrógeno líquido durante el proceso de fricción mecánica con una torunda de plástico, hasta convertirla en polvo. Posteriormente se adicionó tampón SDS de lisis (40-60  $\mu\text{l}$ ) individualmente a cada muestra, moliendo hasta la perfecta homogenización. A continuación se centrifugaron las muestras a 14000 g a 4  $^{\circ}\text{C}$  durante 20 minutos, recogiendo el líquido sobrenadante con todas las proteínas de membrana y citosólicas solubilizadas.

### 2.2.3. Determinación de la concentración proteica

Se calculó la cantidad de proteína de cada muestra, para conocer así el volumen de cada una de ellas necesario para obtener 20  $\mu\text{g}$  de proteína. Siguiendo el método Lowry, se realizaron curvas patrón de albúmina sérica bovina (BSA), de concentraciones crecientes conocidas: 0, 2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; 0, 5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; 0,8  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; 1,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; 2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Tanto las soluciones patrón de BSA como las muestras se localizaron en alícuotas por duplicado de 5  $\mu\text{l}$  en una placa de 96 pocillos, y se añadieron los reactivos que forman un complejo coloreado con las proteínas (Bio Rad-Dc Protein Assay Reagents). Por espectrofotometría se determinó la absorbancia de cada muestra a una longitud de onda de 575 nm, ya que la intensidad de color, y por tanto, la densidad óptica, son proporcionales a la concentración de proteína, según la Ley de Lambert-Beer ( $A=\epsilon \cdot l \cdot C$ ), donde A es la absorbancia obtenida,  $\epsilon$  es la constante de

absortividad,  $l$  es el grosor de la muestra y  $C$  es la concentración. Para ello se utilizó el programa informático *KC4 Data Analysis Software*.

#### 2.2.4. Separación de proteínas por electroforesis

Una vez conocida la concentración proteica de cada muestra se realizaron los cálculos tomando una cantidad de 20  $\mu\text{g}$  de proteína para cada muestra, junto 9  $\mu\text{l}$  de solución tampón de carga NuPAGE® LDS Sample Buffer (4x) (Invitrogen), y hasta 37  $\mu\text{l}$  (cantidad de cada pocillo en el gel de electroforesis), con agua destilada. Tras la preparación de las muestras se procedió a la desnaturalización de las proteínas manteniéndolas a 70 °C durante 10 minutos.

La separación de proteínas por peso molecular se realizó en geles de policacrilamida (pH=6.4) (NuPAGE® 4-12% Bis-Tris-Gel, Invitrogen), con un grosor de 1,5 mm y 10 pocillos por gel, donde se cargaron las muestras correspondientes, a excepción de un pocillo por gel, donde se cargó un patrón molecular (Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Standards, Bio-Rad). Los geles se cargaron con las diferentes muestras alternas, y se situaron en las cubetas de electroforesis cubiertos con solución tampón de dodecil sulfato sódico (SDS) al 5% (NuPAGE® MUPS SDS Running buffer), con una corriente de 370 mA, a 196 V, durante 50 minutos, donde se separaron las proteínas en función de sus pesos moleculares, migrando más lejos aquellas de menor peso molecular.

#### 2.2.5. Transferencia de las proteínas a una membrana

Una vez separadas las proteínas en función de sus pesos moleculares, se procedió a la transferencia de las mismas a una membrana de nitrocelulosa de difluoruro de polivinilo (PVDG 0.2), poniendo en contacto el gel y la membrana mediante un sistema de sandwicheras de plástico perforado, situadas en una cubeta con solución de transferencia 1X, obtenida a partir de la solución de transferencia 10X (ver composición en apartados 1.4.3.3-4), y situado entre dos electrodos planos diseñados para conseguir un campo eléctrico uniforme en toda la superficie y perpendicular al sistema membrana-gel, en dirección a la membrana. La velocidad de transferencia es inversamente proporcional al tamaño de la proteína. Este proceso provoca un gran calentamiento, por lo que las cubetas se sumergen en hielo para refrigerar el sistema. El voltaje aplicado para la transferencia fue de 110 V durante 1 hora y 30 minutos.

### 2.2.6. Incubación de anticuerpos

Tras la transferencia se obtuvieron las membranas con las proteínas separadas por su peso molecular, añadiendo Rojo Ponceau S (Sigma) en solución acuosa para testar la correcta transferencia, que ya tiñe todas las proteínas presentes en la membrana, lavando posteriormente con solución TBS-T 1X (ver composición en apartado 1.4.3.6.) y en movimiento hasta su completo lavado.

El siguiente paso consistió en el bloqueo de la membrana, con leche en polvo desnatada al 5% en TBS-T 1X en el caso de las proteínas no fosforiladas, y con BSA al 5% en el caso de las proteínas fosforiladas, ya que la leche contiene fosfatasas que interfieren.

Tras el bloqueo se procedió a la incubación con el anticuerpo primario, específico para la proteína que se desea detectar sobre la membrana (Tabla II), disueltos en solución de leche (5%) o BSA (5%), según la proteína a detectar fuera fosforilada o no fosforilada, siguiendo el mismo criterio mencionado en el bloqueo de la membrana. La membrana se mantuvo expuesta al anticuerpo primario durante toda la noche, a 4 °C y en agitación lenta. Para eliminar el anticuerpo primario no unido a proteínas, se realizaron 3 lavados con TBS-T 1X de 10 minutos cada uno y con agitación rápida.

A continuación se expusieron las membranas al anticuerpo secundario marcado con biotina, frente al animal de procedencia del anticuerpo primario (anti-conejo o anti-ratón) (Tabla III), manteniéndolo durante un mínimo de 1 hora y 30 minutos, a temperatura ambiente y en agitación lenta. El exceso de anticuerpo secundario se eliminó mediante 3 lavados con TBS-T 1X de 10 minutos cada uno y con agitación rápida.

### 2.2.7. Revelado

El revelado de las proteínas se realizó añadiendo sobre la membrana una solución de luminol (Luminol Reagent, Sta Cruz Biotechnology®), para proteínas no fosforiladas, o de femtol (Super Signal® ELISA Femto Maximum Sensivity Substrate, Thermo Scientific), para proteínas fosforiladas. Ambas contienen un complejo de peroxidasa de rábano capaz de unirse al anticuerpo secundario marcado con biotina, y además tienen la propiedad de emitir fluorescencia, por lo que la cantidad de luminiscencia obtenida es proporcional al anticuerpo secundario, que se une al anticuerpo primario, que a su vez se une específicamente a la

proteína, por lo que la señal obtenida nos da una información cualitativa de la proteína que se desee detectar.

La membrana se introdujo en una cámara de revelado oscura, donde se detectó la luminiscencia y obtuvo la imagen correspondiente mediante el programa informático *Image Reader LAS 3000 Lite*, para Macintosh. La cuantificación se realizó con el programa informático *Image Gauge*, para Macintosh.

#### 2.2.7. Reutilización de las membranas (*Strip*)

Se utilizó cada membrana para la detección de tres proteínas: la proteína fosforilada a estudio (p-eNOS Ser<sup>1177</sup>, p-Akt Ser<sup>473</sup> o p-ERK 1/2), la proteína no fosforilada correspondiente (eNOS, Akt o ERK 1/2, respectivamente), y finalmente la  $\beta$ -actina como control de carga de la cantidad de proteína para cada muestra.

El *strip* consiste en una serie de lavados entre cada detección para eliminar los anticuerpos primario y secundario para realizar la detección de otra proteína en la misma membrana. Se realizaron dos lavados de 20 minutos cada uno con la solución de *strip* (ver composición en apartado 1.4.3.7.) en agitación rápida. Posteriormente se realizaron tres lavados de 10 minutos cada uno con solución de TBS-T 1X (ver composición en apartado 1.4.3.6.), manteniendo la agitación rápida. A continuación se realizó el bloqueo de la membrana con leche desnatada al 5% (para proteínas sin fosforilar) o con BSA al 5% (para proteínas fosforiladas), de 45 minutos, para comenzar de nuevo la incubación con anticuerpos.

Tabla II. Anticuerpos primarios utilizados en Western Blotting.

<i>Proteína</i>	<i>Pm (kDa)</i>	<i>Dilución</i>	<i>Animal</i>	<i>Marca</i>
<b>p-eNOS Ser</b>	140	1:400	Rabbit	Cell Signalling
<b>eNOS</b>	140	1:1000	Mouse	BD Biosciences
<b>p-Akt Ser473</b>	60	1:1000	Rabbit	Cell Signalling
<b>Akt</b>	60	1:1000	Rabbit	Cell Signalling
<b>p-ERK 1/2</b>	42-44	1:1000	Rabbit	Cell Signalling
<b>ERK 1/2</b>	42-44	1:500	Rabbit	Cell Signalling
<b>β-Actina</b>	42	1:1000	Mouse	Sigma

Tabla III. Anticuerpos secundarios utilizados en Western Blotting.

<i>Ac secundario</i>	<i>Dilución</i>	<i>Ac primarios con los que se ha utilizado</i>
<b>Anti-Ig G de conejo</b>	1:20000	p-eNOS Ser <sup>1177</sup> , p-Akt Ser <sup>473</sup> , Akt, p-ERK 1/2 y ERK 1/2
<b>Anti-Ig G de ratón</b>	1:20000	eNOS y β-actina

## 2.3. Estudios morfológicos

### 2.3.1. Inmunocitoquímica

Las muestras de tejido de pene y de corazón incluyendo la arteria dorsal peneana y la arteria coronaria descendiente izquierda, respectivamente, de animales RZL y RZO fueron fijadas por inmersión en paraformaldehído (PFA) al 4% en tampón fosfato salino (PBS) 0.1 M, durante 24 horas a 4 °C. Posteriormente se crioprotegieron con una solución de sacarosa al 30% en PBS con el objeto de evitar la formación de cristales de hielo que pudieran dañar el tejido. A continuación, los bloques de tejido se congelaron con el nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta el momento de ser cortados. Antes de realizar los cortes



histológicos correspondientes, los bloques se dejaron aproximadamente 1 hora en el criostato para que alcanzaran la temperatura óptima para ser cortados como secciones transversales de 10  $\mu\text{m}$  de grosor en un criostato. Las secciones se recogieron en portaobjetos gelatinizados que se congelaron a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su utilización.

Después se procedió a la incubación con el anticuerpo primario, específico  $\text{ET}_A$  o  $\text{ET}_B$  (Tabla IV) durante toda la noche, a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  y en agitación lenta. Para eliminar el anticuerpo primario no unido a proteínas, se realizaron 3 lavados con TBS-T 1X de 10 minutos cada uno y con agitación rápida.

A continuación se expusieron las muestras al anticuerpo secundario marcado con biotina, frente al animal de procedencia del anticuerpo primario (anti-IgG de conejo, dilución 1:20000) manteniéndolo durante un mínimo de 1 hora y 30 minutos, a temperatura ambiente y en agitación lenta. El exceso de anticuerpo secundario se eliminó mediante 3 lavados con TBS-T 1X de 10 minutos cada uno y con agitación rápida.

**Tabla IV. Anticuerpos primarios utilizados para la determinación inmunocitoquímica de los receptores de endotelina.**

<i>Proteína</i>	<i>Dilución</i>	<i>Animal</i>	<i>Marca</i>
<b>Receptor <math>\text{ET}_A</math></b>	1:100	Rabbit	Alomone Labs
<b>Receptor <math>\text{ET}_B</math></b>	1:100	Rabbit	Alomone Labs

### 2.3.2. Tinción estructural

Muestras de tejido de pene y miocardio incluyendo la arteria dorsal peneana y la arteria coronaria izquierda respectivamente, de animales RZL y RZO fueron fijadas, crioprotegidas y cortadas como se ha descrito en el apartado anterior.

Las secciones transversales se tiñeron con la técnica tricrómica de Masson. Se incubaron las secciones con la solución de hematoxilina férrica de Weigert durante 5 minutos, eliminando el exceso de tinción con agua. Después se procedió a la incubación en fucsina ácida durante otros 5 minutos. A continuación se diferenciaron las secciones con ácido tungsto-

fosfórico durante 5 min y se incubaron durante 30-60 segundos en azul de anilina. Por último, las secciones se deshidrataron utilizando etanol en concentraciones crecientes, para después aclarar con xileno y cubrir con un cubreobjetos para ver al microscopio.

## 2.4. Cálculo y análisis estadístico de los resultados

Las respuestas mecánicas de los vasos se expresan con tensión activa, es decir, el incremento de la fuerza registrada ( $\Delta F$ , en mN) dividido por dos veces la longitud del segmento arterial ( $a$ , en m):

$$\Delta T = \Delta F / 2a$$

La sensibilidad de los agonistas relajantes y contráctiles en las arterias se expresa en términos de concentración eficaz 50 ( $CE_{50}$ ), que se define como la concentración del agonista que origina el 50% del efecto máximo ( $E_{max}$ ). El  $pD_2$  es el valor negativo del logaritmo de la  $CE_{50}$ :  $pD_2 = -\log[CE_{50}]$ .

La concentración máxima de los agonistas se expresa en valores absolutos ( $Nm^{-1}$ ) o relativos, como porcentaje de la respuesta contráctil máxima inducida por un agonista en cada arteria o porcentaje de la respuesta al KPSS.

La  $CE_{50}$  fue estimada determinando el ajuste (“fitting”) de la respuesta del vaso según la ecuación de Hill:

$$R = \frac{R_{máx} \cdot A(M)^n}{A(M)^n + CE_{50}(M)^n}$$

Donde **R** es la respuesta máxima del vaso para la concentración **A (M)** del agonista, **R<sub>máx</sub>** es la respuesta máxima del vaso para el agonista, y **n** es un parámetro de ajuste de la curva o “*Coeficiente de Hill*”. El ajuste a la ecuación fue realizado con el programa informático GraphPad Prim 5.0. Las diferencias de estimar la  $CE_{50}$  por interpolación frente al ajuste de una curva son insignificantes, pero la ventaja de usar el ajuste no-lienal es la posibilidad de estimar el *Coeficiente de Hill* que puede dar la información sobre el carácter de la respuesta del vaso.

Todos los resultados obtenidos se expresan en forma de media  $\pm$  error estándar de la media (E.S.M.) La evaluación estadística de las diferencias entre medias se ha realizado utilizando el test de la *t de student* para observaciones no pareadas, siempre y cuando la muestra se ajuste a una distribución normal o *Gaussiana*. La evaluación de las diferencias significativas entre medias de diversos grupos se llevó a cabo mediante el análisis de varianza (ANOVA) seguido de un *Test de Bonferoni* como post-test. Fue considerado significativo un nivel de probabilidad por debajo de un 5% ( $P < 0,05$ ).



#### **IV. RESULTADOS**



## 1. PARÁMETROS GENERALES

### 1.1. Parámetros metabólicos

En el presente estudio se utilizaron 63 RZL y 64 RZO. En la Tabla 1 se muestran los valores medios del peso y edad de los animales, así como sus niveles plasmáticos de glucosa, insulina, colesterol y triglicéridos.

En el momento del experimento, las ratas contaban con 17-19 semanas de edad, y las RZO pesaron significativamente más que RZL (Tabla 1). Mediante los análisis de la sangre extraída se observó que los animales obesos sufrían hipersinsulinemia, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia y ligera hiperglucemia, a diferencia de los animales sanos (Tabla 1).

**Tabla 1. Parámetros metabólicos de RZL y RZO.**

	RZL	n	RZO	n
Peso corporal (g)	379 ± 4	63	483 ± 4 <sup>***</sup>	64
Edad (semanas)	17-19	-	17-19	-
[Glucosa] <sub>sangre</sub> (mg/dl)	101 ± 4	10	138 ± 17 <sup>*</sup>	10
[Insulina] <sub>plasma</sub> (ng/ml)	1.2 ± 0.2	6	3.9 ± 0.4 <sup>***</sup>	6
[Colesterol] <sub>plasma</sub> (mg/dl)	94 ± 5	10	193 ± 16 <sup>***</sup>	16
[Trigliceridos] <sub>plasma</sub> (mg/dl)	79 ± 6	10	331 ± 41 <sup>***</sup>	10

Valores medios del peso, edad y niveles plasmáticos de glucosa, insulina, colesterol y triglicéridos de RZL y RZO. Los datos se expresan como media ± ESM de n número de animales. Las diferencias se analizaron por un test de la *t de Student* no pareado. \*P<0.05; \*\*P<0.001; \*\*\*P<0.0001 vs RZL.

## 1.2. Características de la función vasomotora de las arterias penenanas y coronarias de la rata Zucker

### 1.2.1. Arterias peneanas

Las características de la función vasomotora de las arterias penenanas de RZL y de RZO se muestran en la Tabla 2. El diámetro luminal interno ( $l_1$ ) fue significativamente menor en arterias peneanas de RZO que en las de RZL. La contracción inducida por despolarización con una solución rica en  $K^+$  (KPSS) fue menor en las arterias peneanas de animales obesos. Las relajaciones inducidas por el agonista endotelial ACh (10  $\mu$ M) fueron menores en las arterias de RZO vs RZL.

**Tabla 2. Características de la función vasomomotora de las arterias peneanas.**

	RZL	n	RZO	n
$l_1$ ( $\mu$ m)	$151 \pm 5$	55	$136 \pm 4^*$	59
KPSS ( $Nm^{-1}$ )	$2.41 \pm 0.13$	56	$2.01 \pm 0.11^*$	60
ACh (Relajación %)	$58 \pm 4$	27	$43 \pm 5^*$	38

Los datos se expresan como la media  $\pm$  ESM de n número de arterias (1-2 por animal). Las diferencias entre RZL y RZO se evaluaron con un test de la *t de Student* no pareado. \* $P < 0.05$ .

### 1.2.2. Arterias coronarias

Las características de la función vasomotora de las arterias coronarias de RZL y de RZO se muestran en la Tabla 3. No se observaron diferencias significativas en el diámetro luminal interno ( $l_1$ ) entre las arterias coronarias de RZL y de RZO. Tampoco existieron diferencias en la contracción inducida por KPSS, ni en la relajación inducida por ACh en las arterias coronarias de RZO a comparadas con las de RZL.

**Tabla 3. Características de la función vasomotora de las arterias coronarias.**

	LZR	n	OZR	n
$l_1$ ( $\mu\text{m}$ )	$277 \pm 10$	41	$277 \pm 9$	43
KPSS ( $\text{Nm}^{-1}$ )	$0.68 \pm 0.05$	41	$0.72 \pm 0.03$	43
ACh (Relajación %)	$80 \pm 3$	37	$70 \pm 4$	38

Los datos se expresan como la media  $\pm$  ESM de n número de arterias (1-2 por animal). Las diferencias entre RZL y RZO se estudiaron con un test de la *t de Student* no pareado.

### 1.3. Características estructurales de las arterias peneanas y coronarias

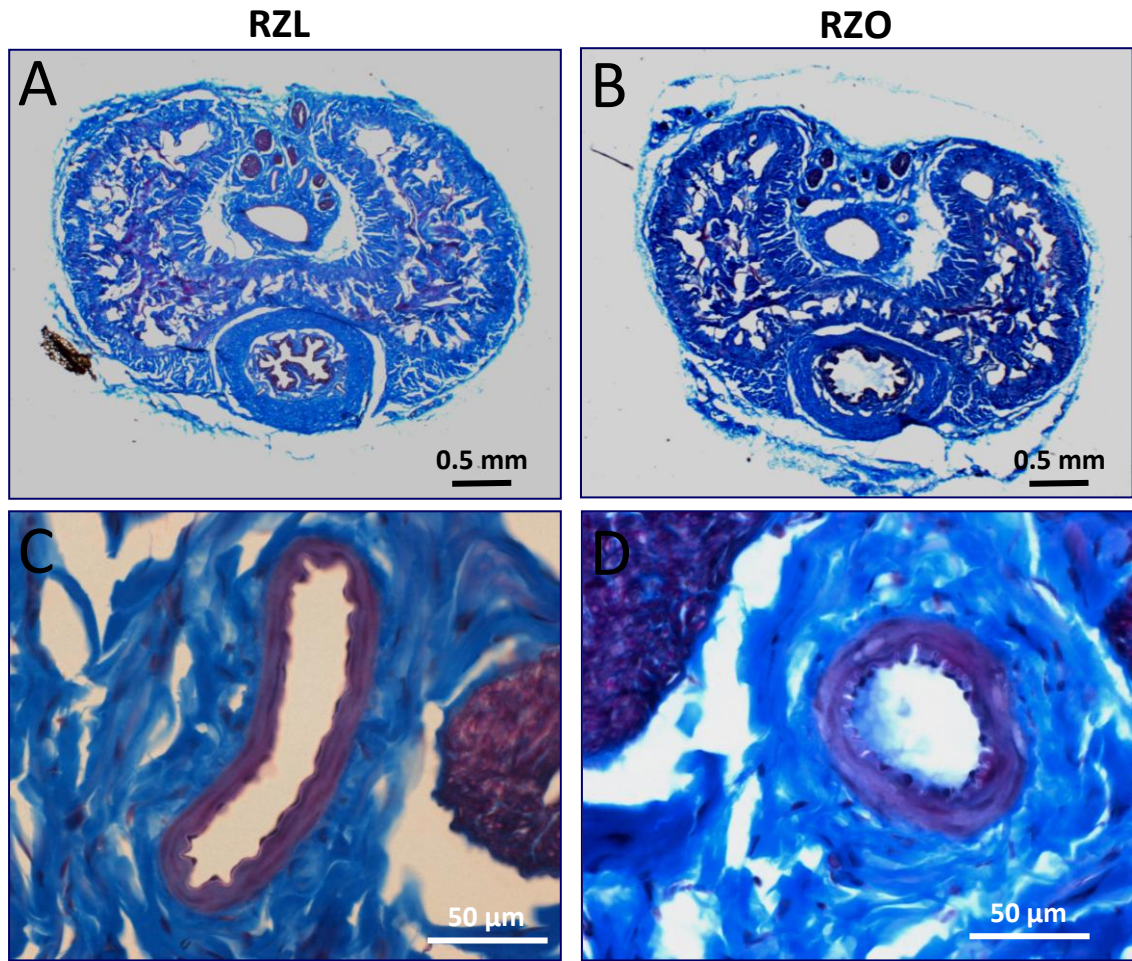
Mediante la técnica de tinción tricrómica de Masson se examinó la estructura de las arterias coronarias y peneanas de RZL y RZO en secciones transversales de los penes y corazones.

#### 1.3.1. Características estructurales de las arterias penenas y coronarias

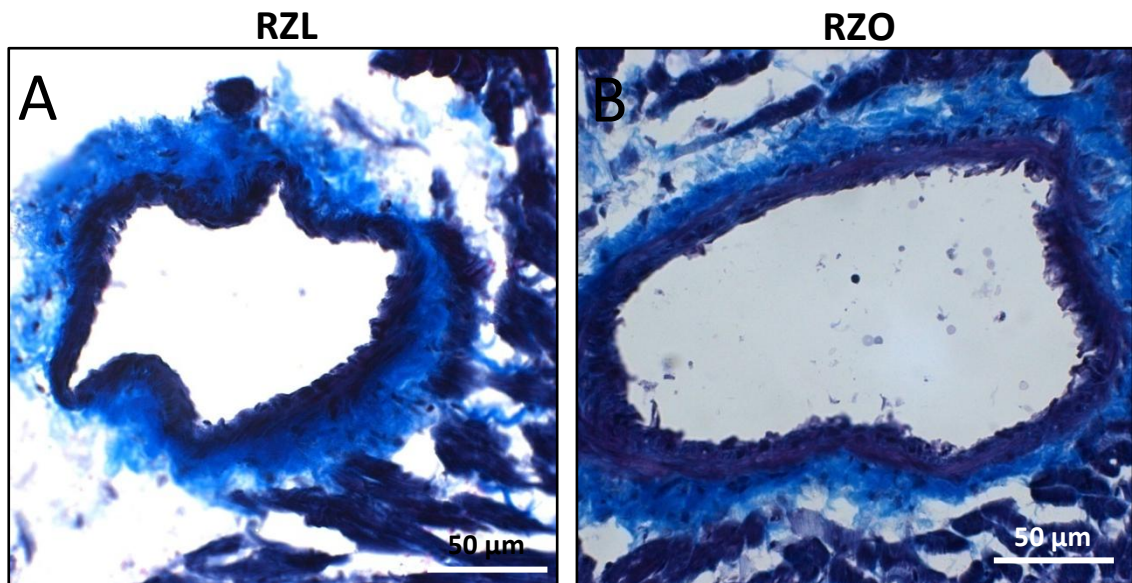
El diámetro de las arterias dorsales penenanas de RZO fue menor que el de las RZL, lo que estaría en concordancia con los menores diámetros obtenidos mediante la normalización de estas arterias en el miógrafo microvascular. El grosor de la capa media fue mayor en arterias de RZO comparadas con las de RZL (Figura 1, Tabla 2).

No parece existir diferencias entre los diámetro de las arterias coronarias de RZL y RZO, corroborando los datos obtenidos mediante la normalización de estas arterias en los miógrafos microvasculares (Figura 2, Tabla 3).





**Figura 1. Tinción tricrómica de las arterias peneanas de RZL (A, C) y RZO (B, D).** Remodelado vascular en arterias peneanas de RZO (derecha), con disminución del diámetro interno y engrosamiento de la capa media. **A:** Arteria dorsal peneana; **V:** vena.

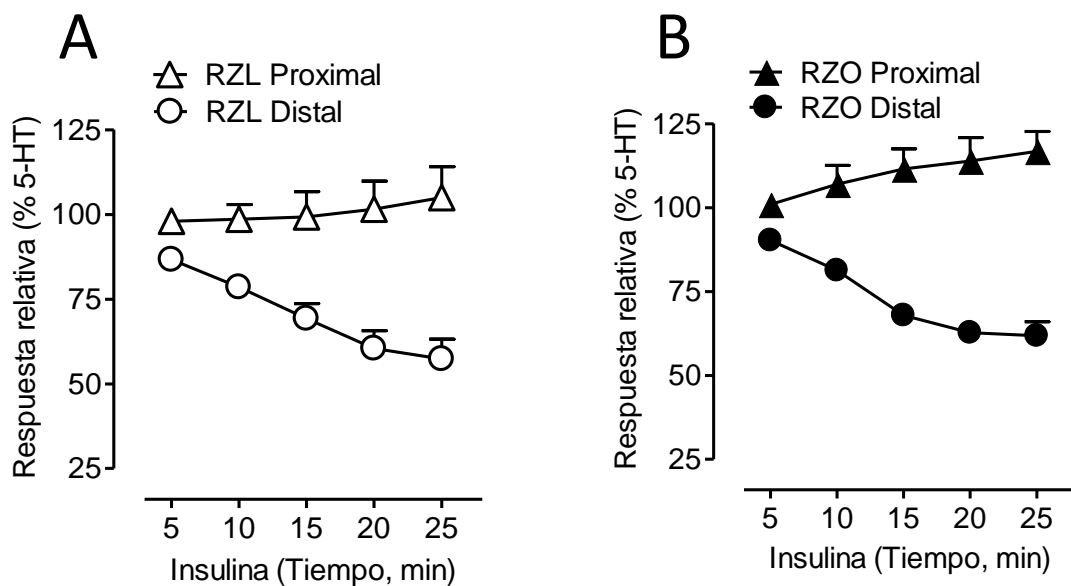


**Figura 2. Tinción tricrómica de las arterias coronarias de LZR (izquierda) y de RZO (derecha).** No se aprecian diferencias significativas en la morfología de la arteria coronaria entre animales sanos y obesos.

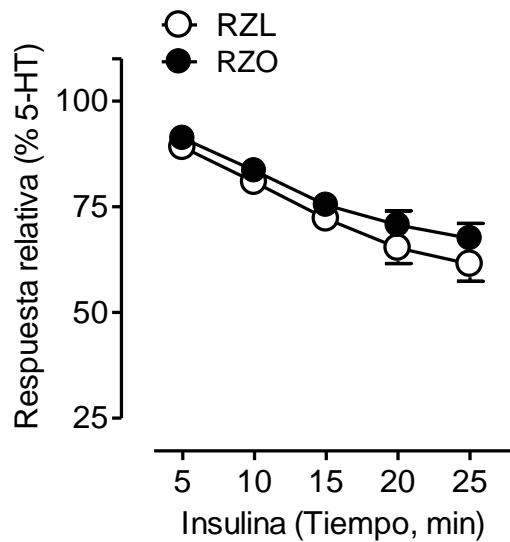
## 2. EFECTOS VASOACTIVOS Y VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR DE LA INSULINA EN ARTERIAS CORONARIAS DE RZL Y RZO

### 2.1. Efecto de la insulina sobre la contractilidad de las arterias coronarias de RZL y RZO

La respuesta a la insulina de las arterias coronarias fue diferente en los distintos segmentos arteriales de la arteria coronaria descendente izquierda, dependiendo de su localización y diámetro. En los segmentos arteriales intramiocárdicos de RZL y de RZO, la insulina indujo una respuesta vasodilatadora, mientras que en segmentos más proximales y de mayor diámetro, no se observó respuesta relajante, o incluso la insulina indujo contracción (Figura 3A y B). Debido a esta diferencia en la reactividad a la insulina en los diferentes segmentos arteriales, en los experimentos posteriores se utilizaron segmentos distales intramiocárdicos. La insulina indujo vasodilatación de similar magnitud en las arterias coronarias intramiocárdicas de RZL y RZO (Figura 4).



**Figura 3. Diferencias regionales en los efectos vasoactivos de la insulina en arterias coronarias de RZL y RZO.** La insulina indujo vasodilatación en los segmentos distales intramiocárdicos de RZL (A) y RZO (B), sin embargo en los segmentos proximales la respuesta fue vasoconstrictora. Los datos se expresan como media  $\pm$  ESM de 8-10 segmentos arteriales (1-2 por animal).

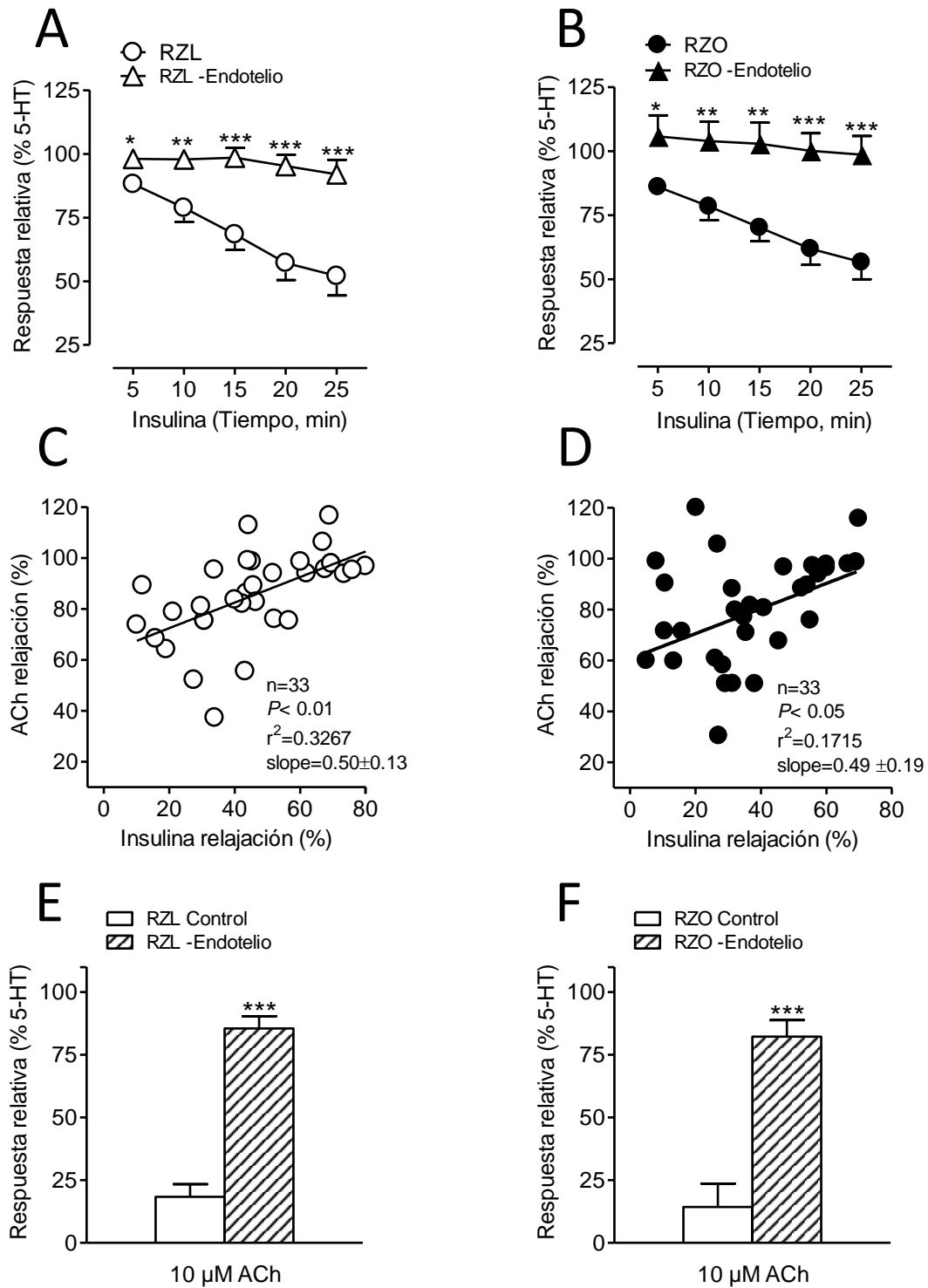


**Figura 4.** La insulina induce una vasodilatación similar en arterias coronarias de RZL y de RZO. Los datos se expresan como media  $\pm$  ESM de 41-43 arterias, 1-2 por animal.

## 2.2. Papel del endotelio en la respuesta relajante de la insulina en las arterias coronarias de RZL y RZO

La retirada mecánica del endotelio abolió la relajación inducida por la insulina en arterias coronarias de RZL y de RZO (Figura 5A y B). Además, se observó una correlación lineal positiva entre las relajaciones inducidas por la insulina ( $0.1 \mu\text{M}$ ) y las relajaciones inducidas por el agonista endotelial ACh ( $10 \mu\text{M}$ ), tanto en arterias peneanas de RZL (Figura 5C) como de RZO (Figura 5D).

La ausencia funcional de endotelio tras la retirada mecánica del mismo se verificó por la ausencia de efecto vasodilatador de la ACh (Figura 5E y F). Los valores de relajación máximos a la ACh en RZL fueron de  $81.6 \pm 5.0\%$  y de  $14.5 \pm 4.9\%$  ( $P < 0.0001$ ,  $n=10$ ) en arterias con y sin endotelio respectivamente, y en RZO de  $85.7 \pm 9.4\%$  y de  $17.8 \pm 6.6\%$  ( $P < 0.0001$ ,  $n=8-9$ ) en arterias con y sin endotelio, respectivamente.



**Figura 5. La vasodilatación inducida por la insulina en arterias coronarias de RZL y RZO es dependiente de endothelium.** (A, B) La retirada mecánica del endothelium inhibe las respuestas relajantes de la insulina en RZL y en RZO. (C y D) Existe una correlación positiva entre las respuestas relajantes máximas de la insulina y de ACh (endothelium-dependiente) tanto en RZL como en RZO. La retirada del endothelium fue verificada por la ausencia de la relajación a una dosis de ACh (10 μM). Los datos se expresan como media ± ESM de 8-10 arterias, 1-2 por animal. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.0001, utilizando un test de la *t* de Student no pareado.

### 2.3. Papel de la vía de la PI3K/Akt/eNOS en la respuesta vasodilatadora a la insulina de las arterias coronarias de RZL y RZO

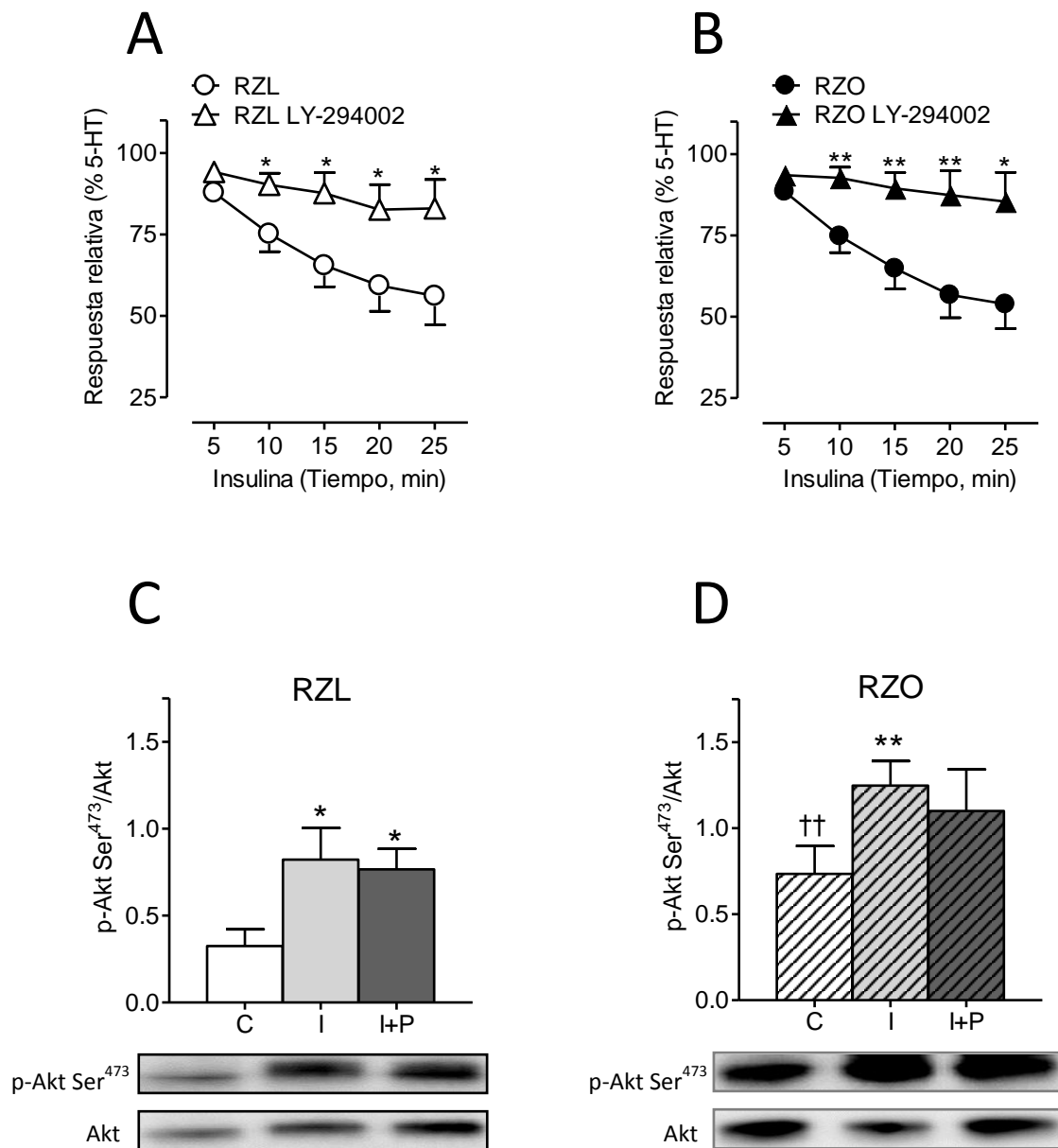
#### 2.3.1. Efecto de la inhibición de PI3K sobre las respuestas relajantes a la insulina y análisis por inmunoblot de la fosforilación de Akt en Ser<sup>473</sup> en arterias coronarias de RZL y RZO

Debido a que la fosforilación de PI3K y Akt es un paso esencial de las vías de señalización de la insulina en el endotelio vascular, se determinaron los efectos de la inhibición farmacológica de la vía sobre la vasodilatación inducida por la insulina en las arterias coronarias, así como la expresión y actividad de Akt, y sus posibles alteraciones por el efecto de los ácidos grasos en arterias coronarias de RZR y RZO.

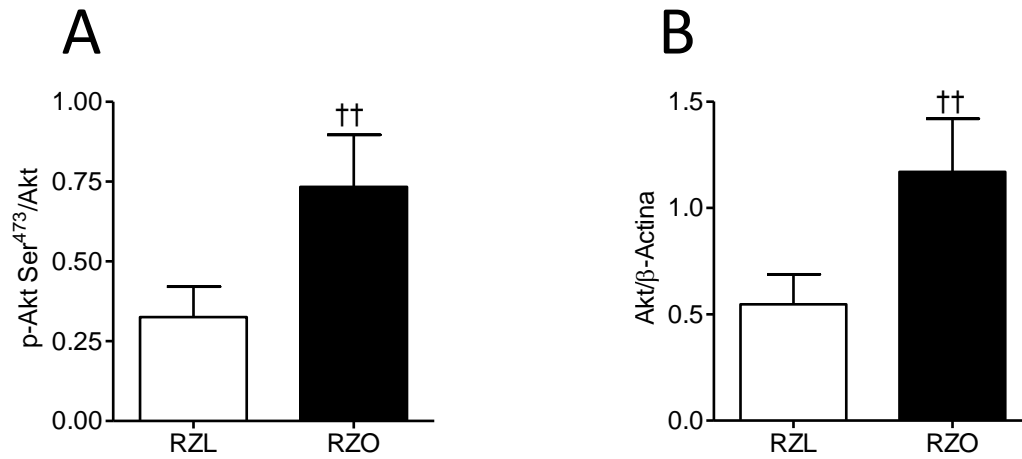
La inhibición de PI3K con LY-294002 (3  $\mu$ M) redujo significativamente, y en similares proporciones, el efecto vasodilatador inducido por la insulina en arterias coronarias de RZL y de RZO (Figura 6A y B). Mediante Wester Blotting se determinó la fosforilación de Akt en la posición Ser<sup>473</sup> inducida por la insulina, como medida de su actividad enzimática, así como el efecto de una concentración suprafisiológica de ácido palmítico sobre la misma. La insulina incrementó la fosforilación de Akt en Ser<sup>473</sup> tanto en arterias coronarias de RZL como de RZO, y esta respuesta no se vio modificada por el tratamiento agudo con ácido palmítico (Figura 6C y D).

Sin embargo, los niveles basales de phospho-Akt Ser<sup>473</sup> se encontraron incrementados en arterias coronarias de RZO aproximadamente el doble que los valores basales en RZL, (Figura 7A). Además, la expresión de Akt total, normalizada a los niveles de  $\beta$ -actina, también fue mayor en arterias coronarias de animales obesos (Figura 7B).

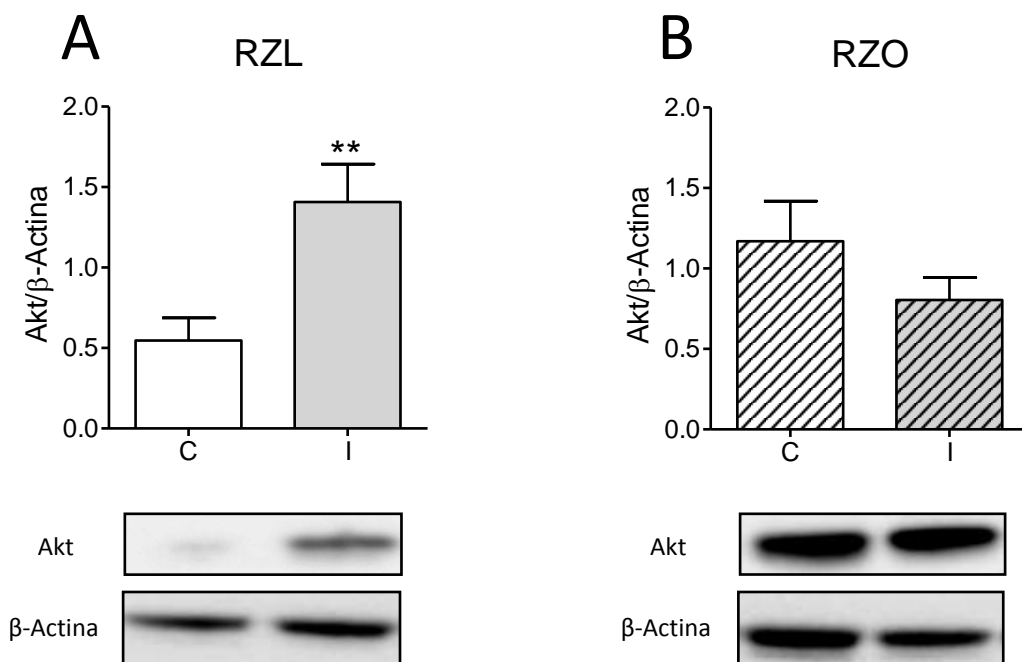
De forma interesante, la insulina no sólo incrementó la fosforilación de Akt en la Ser<sup>473</sup>, sino también la expresión de Akt normalizada a los niveles de  $\beta$ -actina en arterias coronarias de animales sanos (Figura 8A), no así en animales obesos donde la expresión de Akt total se encontraba previamente incrementada (Figura 8B).



**Figura 6. La vía de la PI3K/Akt activada por la insulina se encuentra preservada en arterias coronarias de RZO.** (A y B) La inhibición de PI3K con LY-294002 (3  $\mu$ M), disminuyó significativamente la respuesta relajante a la insulina en arterias coronarias tanto de RZL como de RZO. Los datos se expresan como media  $\pm$  ESM de 8-10 arterias, 1-2 por animal. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs controles sin tratamiento, utilizando un test de la *t de Student* no pareado. (C y D) Western inmunoblotting de p-Akt Ser<sup>473</sup> normalizada al contenido de Akt total en arterias coronarias de RZL (C) y RZO (D) bajo condiciones basales (C), en arterias estimuladas con insulina 0.1  $\mu$ M durante 25 minutos (I), y en arterias estimuladas con insulina tras el tratamiento agudo de 2 horas con ácido palmítico 500  $\mu$ M (I+P). Los datos se expresan como media  $\pm$  ESM de 14-16 arterias, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs condiciones basales, †† $P < 0.01$  vs RZL.

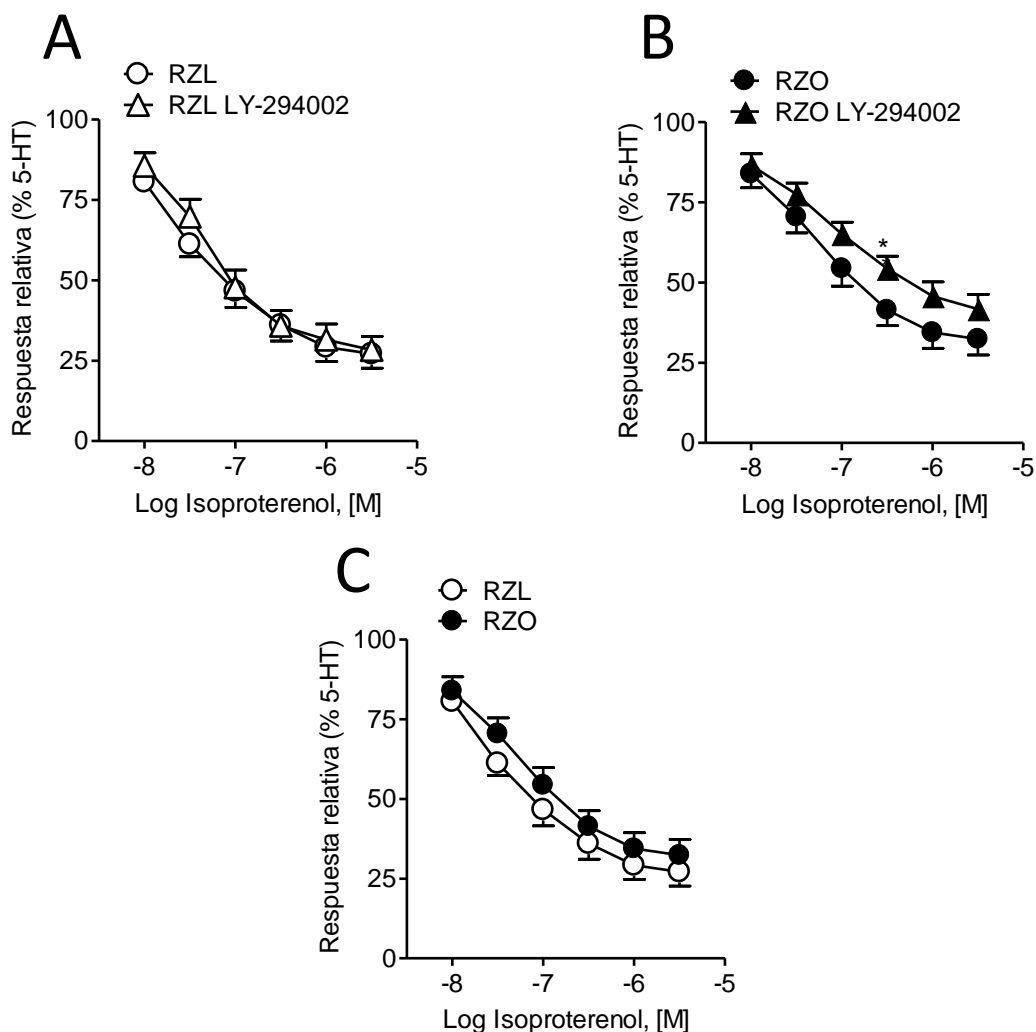


**Figura 7. La actividad y la expresión basal de Akt se encuentran incrementadas en arterias coronarias de RZO.** (A) Niveles basales de phospho-Akt Ser<sup>473</sup> en arterias coronarias de RZL y RZO. (B) Expresión de Akt total en arterias coronarias de RZL y RZO. Los datos se expresan como media  $\pm$  ESM de 13-16 arterias,  $^{\dagger\dagger}P<0.01$  vs RZL utilizando un test de la *t* de Student no pareado.



**Figura 8. La insulina incrementa la expresión de Akt en arterias coronarias de RZL pero no de RZO.** Western inmunoblotting de la expresión de Akt total normalizada al contenido de β-actina en arterias coronarias de (A) RZL y (B) RZO bajo condiciones basales (C) y en arterias estimuladas con insulina 0.1  $\mu$ M durante 25 minutos (I). Los datos se expresan como media  $\pm$  ESM de 14-16 arterias.  $^{**}P<0.01$  vs condiciones basales.

Se evaluó la posible alteración del efecto del agonista  $\beta$ -adrenérgico isoproterenol bajo condiciones de resistencia a la insulina/Síndrome Metabólico, así como la implicación de la vía PI3K/Akt en dicha respuesta, utilizando el inhibidor de PI3K LY-294002 en arterias peneanas de RZL y de RZO. El isoproterenol indujo una respuesta relajante que no fue significativamente diferente en arterias de RZO comparadas con RZL (Figura 9C). La inhibición de PI3K no modificó esta respuesta en arterias coronarias de RZL (Figura 9A), sin embargo inhibió la relajación de RZO (Figura 9B), lo que indica la implicación de esta vía la vasodilatación  $\beta$ -adrenérgica coronaria durante el síndrome metabólico, probablemente como consecuencia de la regulación a la alta de la misma demostrada anteriormente.



**Figura 9. La respuesta  $\beta$ -adrenérgica es dependiente de PI3K en RZO pero no en RZL.** La inhibición de PI3K no afectó la respuesta relajante  $\beta$ -adrenérgica en arterias coronarias de RZL (A), pero inhibió la de RZO (B). No existen diferencias entre la vasodilatación inducida por isoproterenol entre RZL y RZO (C). Los datos se expresan como media  $\pm$  ESM de 19-20 arterias, 1-2 por animal. \* $P < 0.05$  vs arterias control utilizando un test de la *t* de Student no pareado.

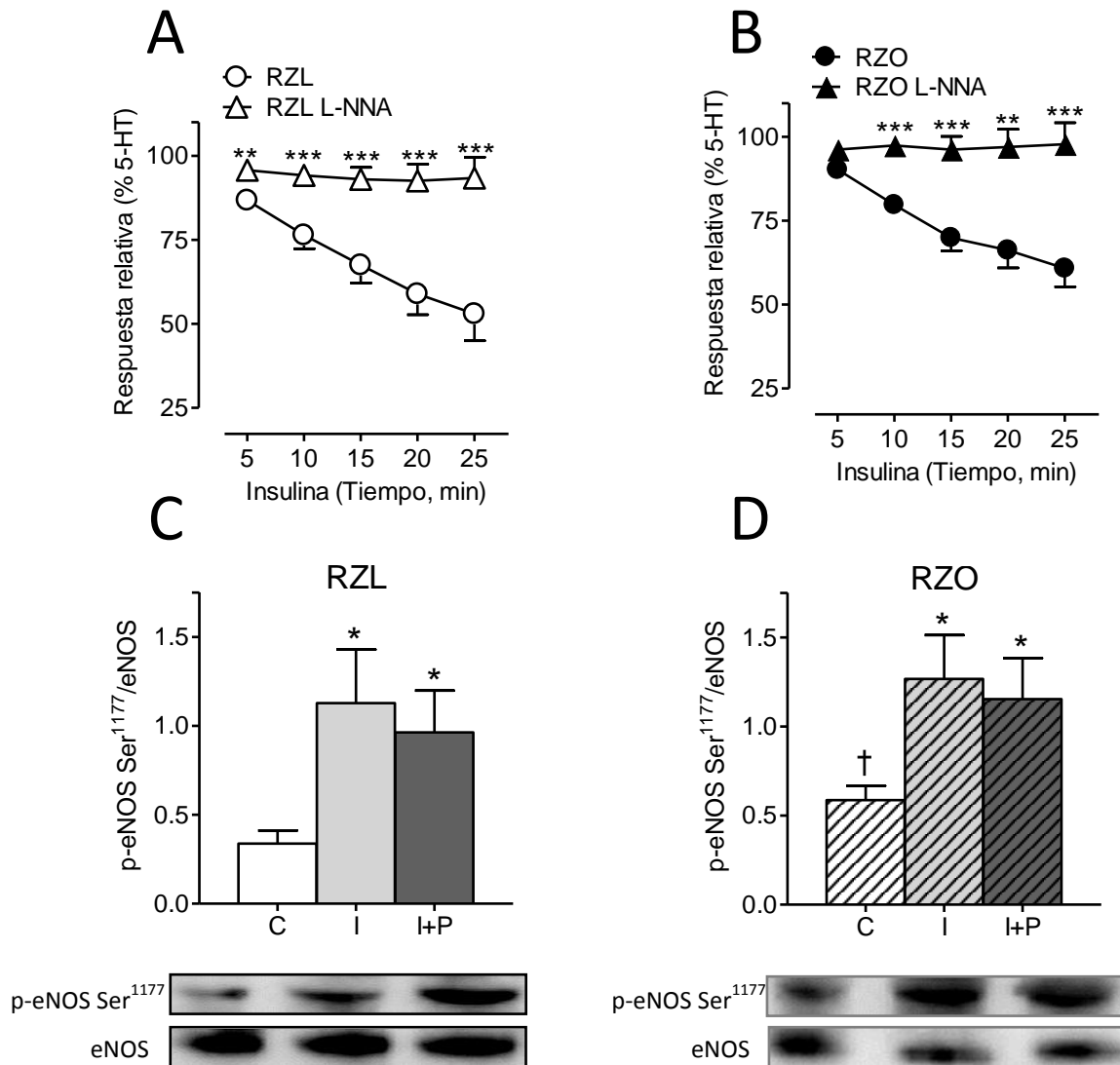


### 2.3.2. Efecto de la inhibición de la NOS en las respuestas relajantes a la insulina y análisis por inmunoblot de la fosforilación y expresión de eNOS en arterias coronarias de RZL y RZO

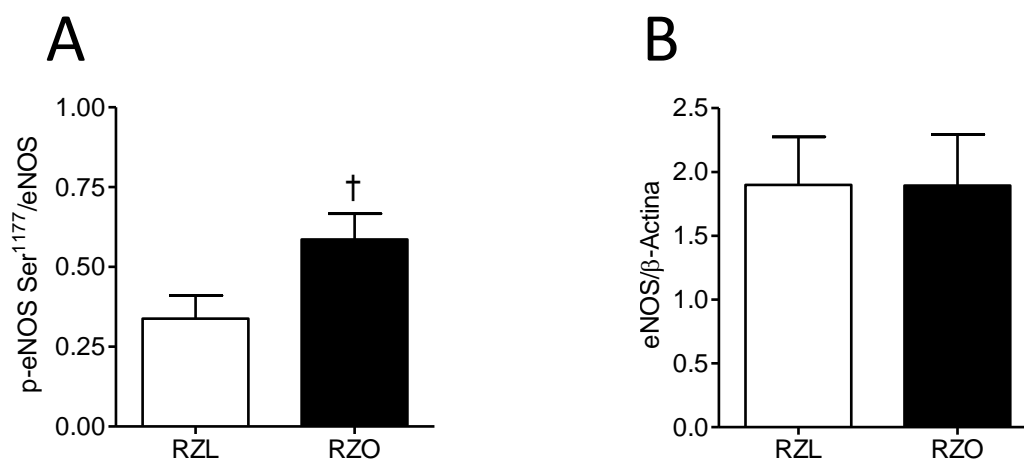
Con objeto de determinar la implicación de NO en la vasodilatación inducida por la insulina en arterias coronarias de RZL y RZO, se inhibió farmacológicamente la enzima NOS con el inhibidor L-NNA (100  $\mu$ M). El tratamiento con L-NNA redujo significativamente las relajaciones en RZL y RZO (Figura 10A y B), lo que sugiere que la insulina estimula la producción de NO en arterias de animales tanto sanos como obesos.

Con el fin establecer las vías de señalización implicadas en la relajación a la insulina, y si podrían estar afectadas por concentraciones patológicas de ácidos grasos saturados, se llevó a cabo el análisis por Western Blotting de la actividad de eNOS mediante su fosforilación en la Ser<sup>1177</sup>, en arterias coronarias bajo condiciones basales, estimuladas con insulina, y estimuladas con insulina tras el tratamiento agudo con ácido palmítico (500  $\mu$ M). Así, la insulina incrementó la fosforilación de eNOS en la Ser<sup>1177</sup> tanto en RZL como en RZO y estas respuestas no fueron afectadas por el ácido palmítico (Figura 10C y D).

De forma interesante, los niveles basales de la fosforilación de eNOS en Ser<sup>1177</sup> normalizados al contenido de eNOS total estuvieron incrementados en arterias coronarias de animales obesos vs RZL (Figura 11A), a pesar de que la expresión total de eNOS normalizada al contenido de  $\beta$ -actina no fue distinta entre ambos grupos de ratas (Figura 11B).



**Figura 10. La vasodilatación inducida por la insulina en arterias coronarias es dependiente de NO tanto en RZL como en RZO.** (A y B) La inhibición de NOS con L-NNA (100  $\mu$ M) abolió la vasodilatación inducida por insulina en RZL y RZO. Los datos se expresan como media  $\pm$  ESM de 6-9 arterias, 1-2 por animal. \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.0001$  vs controles sin tratamiento. (C y D) Western inmunoblotting de p-eNOS Ser<sup>1177</sup> normalizado al contenido de eNOS total en arterias coronarias de RZL y RZO bajo condiciones basales (C), tras 25 minutos de estimulación con insulina 0.1  $\mu$ M (I), y en arterias estimuladas con insulina tras el tratamiento agudo con ácido palmítico 500  $\mu$ M (I+P). Los datos se expresan como la media  $\pm$  ESM de 17-19 arterias, 1 por animal. \* $P < 0.05$  vs condiciones basales, † $P < 0.05$  vs RZL.



**Figura 11. La actividad de eNOS pero no su expresión está incrementada en arterias coronarias de RZO.** (A) Niveles de phospho-eNOS Ser<sup>1177</sup> en arterias coronarias de RZL y RZO. (B) Expresión de eNOS total en arterias coronarias de RZL y RZO. Los datos se expresan como media  $\pm$  ESM de 17-18 arterias, †P<0.05 vs RZL utilizando un test de la *t* de Student no pareado.

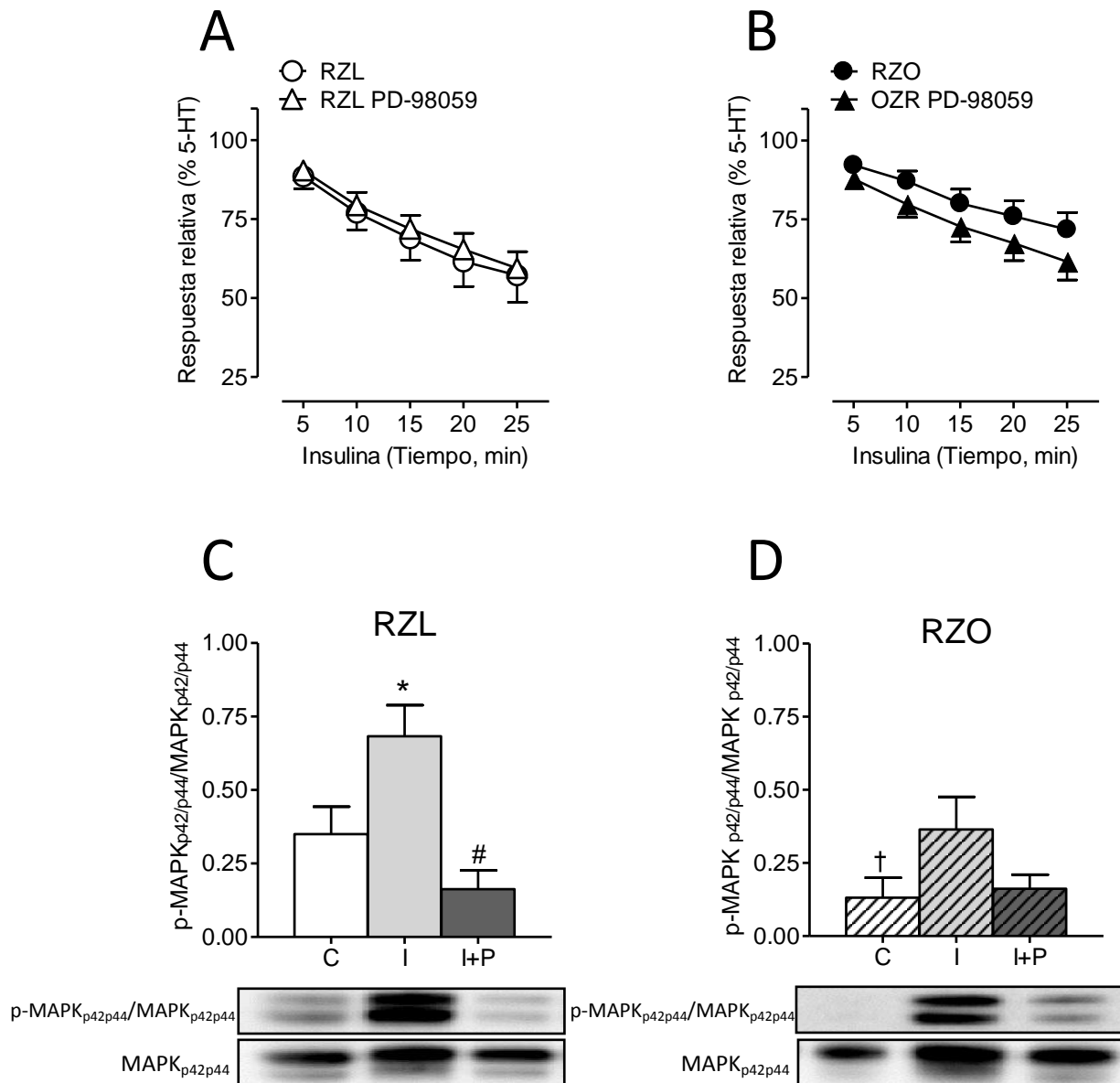
## 2.4. Papel de la vía MAPK/ERK en la respuesta vasodilatadora a la insulina de las arterias coronarias de RZL y RZO

La vía de señalización intracelular de las MAPK generalmente se opone a las acciones vasodilatadoras de la insulina mediante la producción de ET-1, y por ello se determinó su papel en las respuestas relajantes inducidas por la hormona en las arterias coronarias, determinando el efecto de la inhibición de la enzima y de los receptores de ET-1. También se estudió la actividad y expresión de MAPK por Western Blotting.

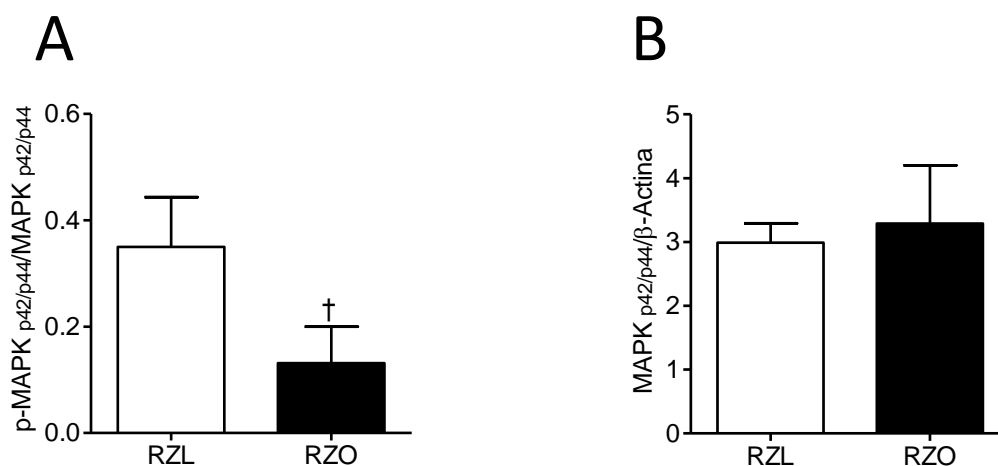
### 2.4.1. Inhibición de MAPK y Western Blotting de su actividad y expresión

El inhibidor selectivo de MAPK PD-98059 (5  $\mu$ M) no modificó de forma significativa las relajaciones a la insulina ni en RZL ni en RZO (Figura 12A y B). Sin embargo el análisis de Western Blotting mostró que la insulina activa la fosforilación de MAPKKp42/p44 en arterias coronarias de RZL pero no de RZO, efecto que fue significativamente alterado por el tratamiento agudo con concentraciones suprafisiológicas de ácido palmítico (Figura 12C y D).

Los niveles basales de phospho-MAPKp42/p44 fueron significativamente menores en arterias coronarias de RZO comparadas con RZL (Figura 13A), a pesar de que la expresión total de MAPKp42/p44 normalizada al contenido de  $\beta$ -actina no se vio modificada en animales con resistencia a la insulina en comparación con los controles (Figura 13B).



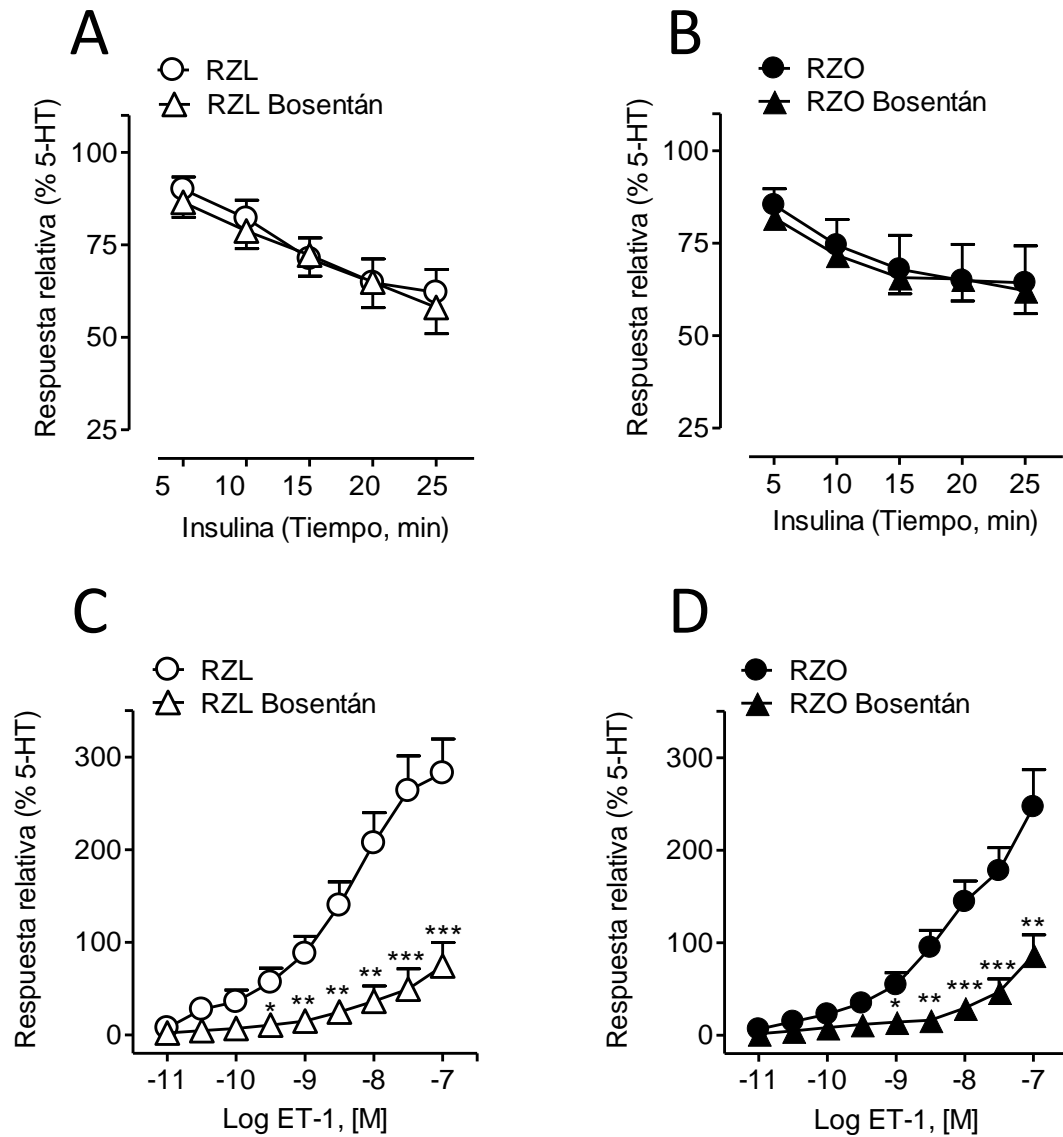
**Figura 12.** La vía de las MAPK es activada por la insulina en arterias coronarias de RZL pero está deprimida en RZO. (A y B) Efecto de la inhibición de MAPK con PD-98059 (5  $\mu$ M) sobre la relajación inducida por la insulina en arterias coronarias de RZL y RZO. Los datos se expresan como media  $\pm$  ESM de 8-11 arterias, 1-2 por animal. (C y D) Western Blotting de phospho-MAPK<sub>p42/p44</sub> en arterias coronarias de RZL y RZO bajo condiciones basales (C), tras 25 minutos de estimulación con insulina 0.1  $\mu$ M (I), y en arterias estimuladas con insulina tras el tratamiento agudo con ácido palmítico 500  $\mu$ M (I+P). Los datos se expresan como media  $\pm$  ESM de 13-15 arterias. \*P<0.05 vs condiciones basales, #P<0.05 vs arterias estimuladas con insulina, †P<0.05 vs RZL.



**Figura 13. La actividad MAPK está alterada en arterias coronarias de RZO.** (A) Western Blotting de los niveles basales de la actividad de phospho-MAPK<sub>p42p44</sub> normalizados por ERK 1/2 total en las arterias coronarias de RZL y RZO. (B) Expresión de ERK 1/2 normalizada al contenido de β-actina en arterias coronarias de RZL y RZO. Los datos se expresan como media ± ESM de 11-15 arterias, 1 por animal. †P<0.05 vs RZL.

#### 2.4.2. Efecto de la inhibición de los receptores de ET-1

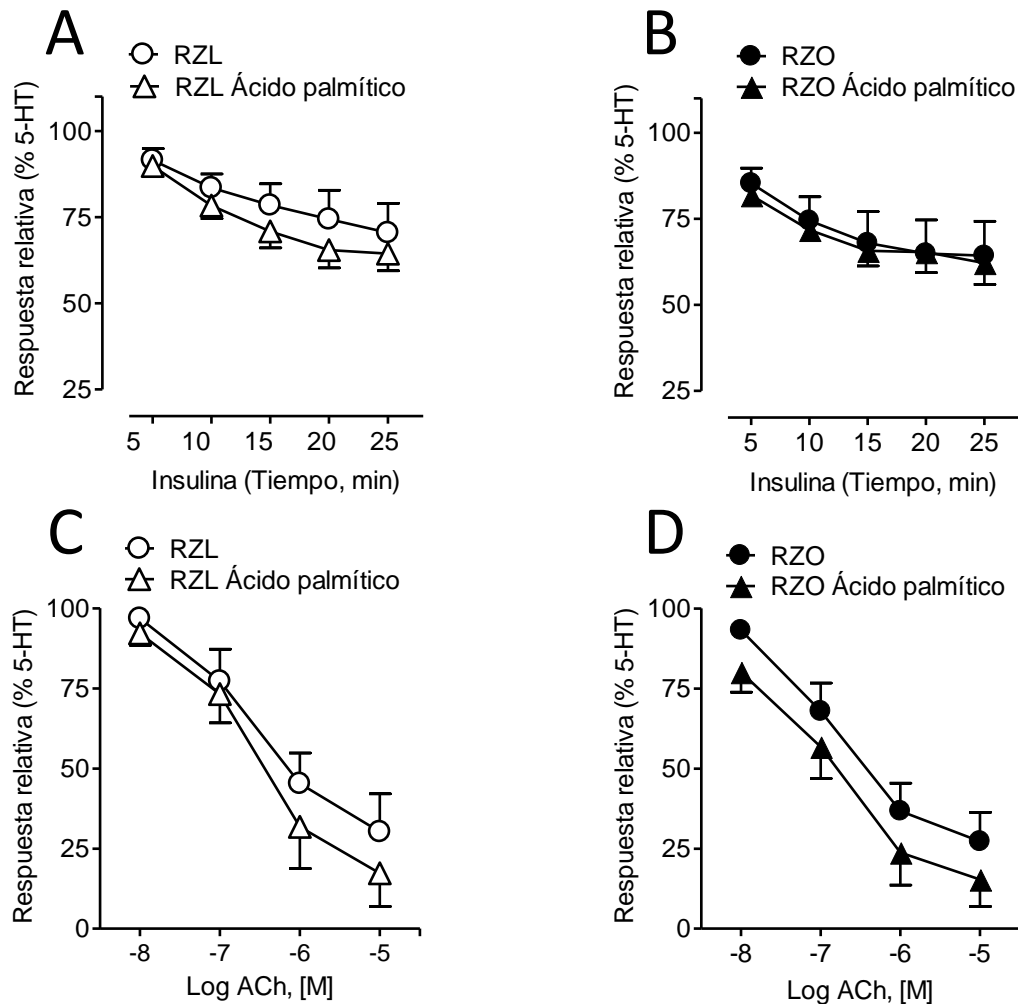
El antagonista no selectivo de los receptores de ET-1, bosentán (10 μM), no modificó las respuestas relajantes a la insulina en arterias coronarias de RZL (Figura 14A) ni de RZO (Figura 14B). Sin embargo, el bosentán inhibió las contracciones inducidas por ET-1 en ambos grupos de animales (Figura 14C y D). Sus respuestas contráctiles máximas expresadas como porcentaje del KPSS fueron de  $282.6 \pm 36.8\%$  en RZL control y  $74.4 \pm 25.2$  en RZL tratadas con bosentán ( $P<0.0001$ ,  $n=7-13$ ) y de  $246.8 \pm 40.1\%$  en RZO control y  $86.4 \pm 22.1\%$  en RZO tratadas con bosentán ( $P<0.01$ ,  $n=9-10$ ).



**Figura 14. Efecto del antagonista de receptores de ET-1 bosentan sobre las relajaciones de insulina y contracciones de ET-1 en arterias coronarias de RZL y RZO.** Efecto de la inhibición de los receptores de ET-1 sobre (A y B) la relajación a la insulina y sobre (C y D) la respuesta contráctil a la ET-1 en arterias coronarias de RZL y RZO. Los datos se expresan como media  $\pm$  ESM de 7-13 arterias, 1-2 por animal. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.0001$  vs controles sin tratar, utilizando un test de la *t* de Student no pareado.

## 2.5. Efecto del ácido palmítico sobre la respuesta vasodilatadora inducida por insulina y ACh en las arterias coronarias de RZL y RZO

Finalmente, se investigó si las concentraciones suprafisiológicas de ácidos grasos saturados podrían afectar las vías de señalización de la insulina en arterias coronarias. El tratamiento agudo con ácido palmítico (500  $\mu$ M) no modificó ni la tensión basal ni las contracciones inducidas por una solución rica en KCl en arterias coronarias de RZL ( $0.46 \pm 0.13$  y  $0.53 \pm 0.18$  Nm $^{-1}$ ,  $n=7$ , antes y después del tratamiento con ácido palmítico) ni de RZO ( $0.53 \pm 0.10$  y  $0.58 \pm 0.10$  Nm $^{-1}$ ,  $n=7$ , antes y después del ácido palmítico). El tratamiento con ácido palmítico tampoco alteró las respuestas vasodilatadoras inducidas por insulina (Figura 15A y B) ni por ACh (Figura 15C y D).

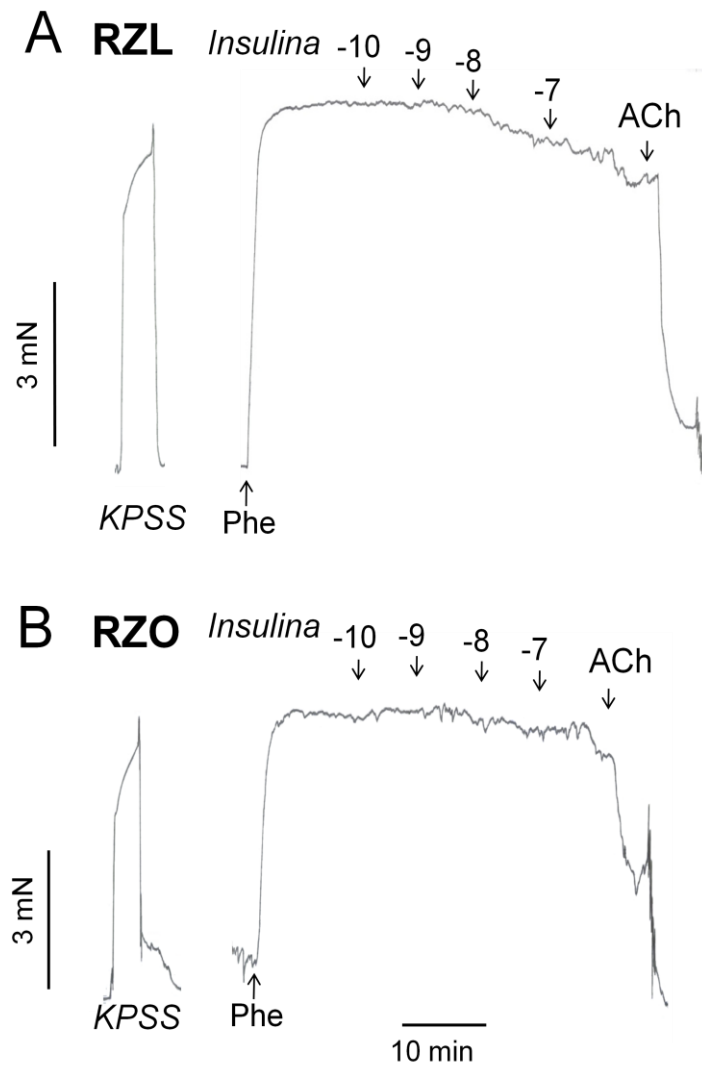


**Figura 15. El ácido palmítico no altera las respuestas relajantes inducidas por insulina ni por ACh en las arterias coronarias de RZL y RZO.** (A y B) Efecto del tratamiento agudo con ácido palmítico sobre las relajaciones inducidas por insulina. (C y D) Efecto del tratamiento agudo con ácido palmítico sobre la vasodilatación dependiente del endotelio inducida por ACh. Los datos se expresan como media  $\pm$  ESM de 7-12 arterias, 1-2 por animal.

### 3. EFECTOS VASOACTIVOS Y VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR DE LA INSULINA EN ARTERIAS PENEANAS DE RZL Y RZO

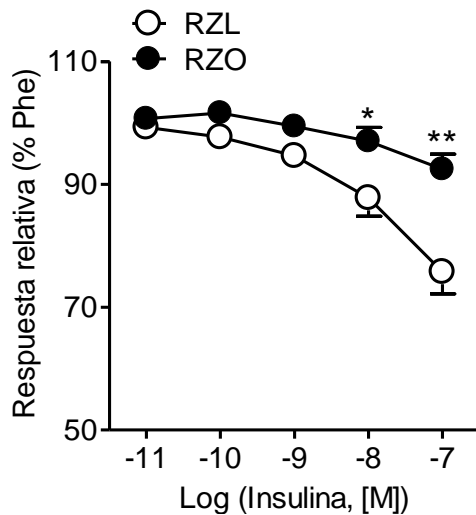
#### 3.1. Efecto de la insulina sobre la contractilidad de las arterias peneanas de RZL y RZO

La insulina indujo un efecto relajante dependiente de la concentración en arterias peneanas precontraídas con Phe, que fue mayor en RZL que en RZO. Los respectivos valores de relajación máxima a la hormona fueron  $21.4 \pm 3.3 \%$  ( $n=29$ ) y  $9.6 \pm 2.7 \%$  ( $n=32$ ,  $P<0,01$  vs RZL) (Figuras 16 y 17).



**Figura 16. Registros representativos de la relajación inducida por la insulina en arterias penenanas de (A) RZL y de (B) RZO.** Las barras verticales muestran la fuerza (mN) y las barras horizontales muestran el tiempo (minutos).





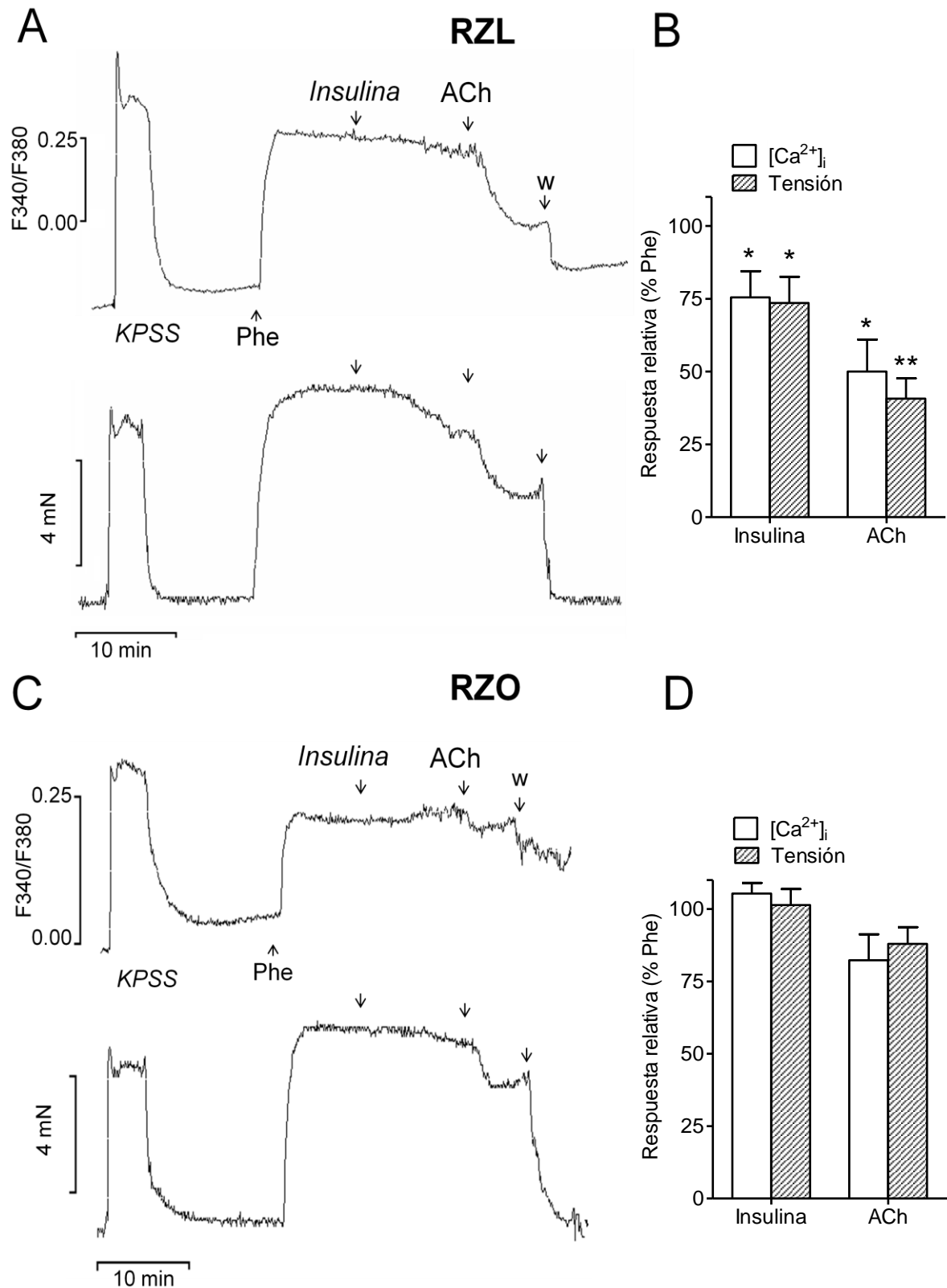
**Figura 17.** La insulina indujo una vasodilatación mayor en arterias peneanas de RZL que de RZO. La gráfica representa la media de las curvas concentración respuesta para el efecto relajante de la insulina en arterias peneanas de RZL y de RZO. Los datos se expresan como la media  $\pm$  ESM de 26 arterias (24 animales, RZL) y de 28 arterias (25 animales, RZO). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs RZL.

### 3.2. Efecto de la insulina sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en las arterias peneanas de RZL y de RZO

Se evaluaron de forma simultánea las variaciones en la  $[Ca^{2+}]_i$  y en la tensión en respuesta a la insulina en arterias peneanas de RZL y RZO. La estimulación de las arterias con una solución rica en  $K^+$  indujo incrementos simultáneos tanto en la  $[Ca^{2+}]_i$  ( $\Delta(F_{340}/F_{380}) = 0.51 \pm 0.05$ ,  $n=7$ , en RZL, y  $0.35 \pm 0.04$ ,  $n=7$ , en RZO,  $P < 0.05$  vs. LZR) como en la tensión ( $1.17 \pm 0.16$  Nm-1,  $n=7$ , en RZL; y  $0.95 \pm 0.18$  Nm-1,  $n=7$ , en OZR,  $P < 0.01$  vs. LZR) (Figura 18).

Las relajaciones inducidas por una dosis de insulina ( $0.1 \mu M$ ) y de ACh ( $10 \mu M$ ) en las arterias peneanas de RZL ( $73.6 \pm 9.0\%$  y  $44.2 \pm 7.3\%$ , respectivamente,  $n=7$ ) fueron acompañadas por disminuciones simultáneas en la  $[Ca^{2+}]_i$  ( $24.5 \pm 9.2\%$  y  $44.2 \pm 13.6\%$ , respectivas respuestas relativas con respecto al incremento de  $[Ca^{2+}]_i$  inducido por Phe,  $1 \mu M$ ,  $n=6$ ) (Figura 18A y B).

Las variaciones en la  $[Ca^{2+}]_i$  inducidas por la insulina y la ACh, estuvieron alteradas en arterias de RZO ( $103.2 \pm 3.6\%$ , \* $P < 0.05$  vs RZL y  $82.3 \pm 10.0\%$ , \* $P < 0.05$  vs LZR, respectivamente,  $n=5-6$ ), junto con las relajaciones a la insulina y ACh ( $101.4 \pm 5.6\%$ , \* $P < 0.05$  vs LZR;  $93.4 \pm 7.3\%$ , \*\* $P < 0.001$  vs LZR, respectivamente,  $n=6$ ), (Figura 18C y D). Incluso, en algunas arterias de RZO, la estimulación con insulina se acompañó eventualmente de incrementos en la  $[Ca^{2+}]_i$ .



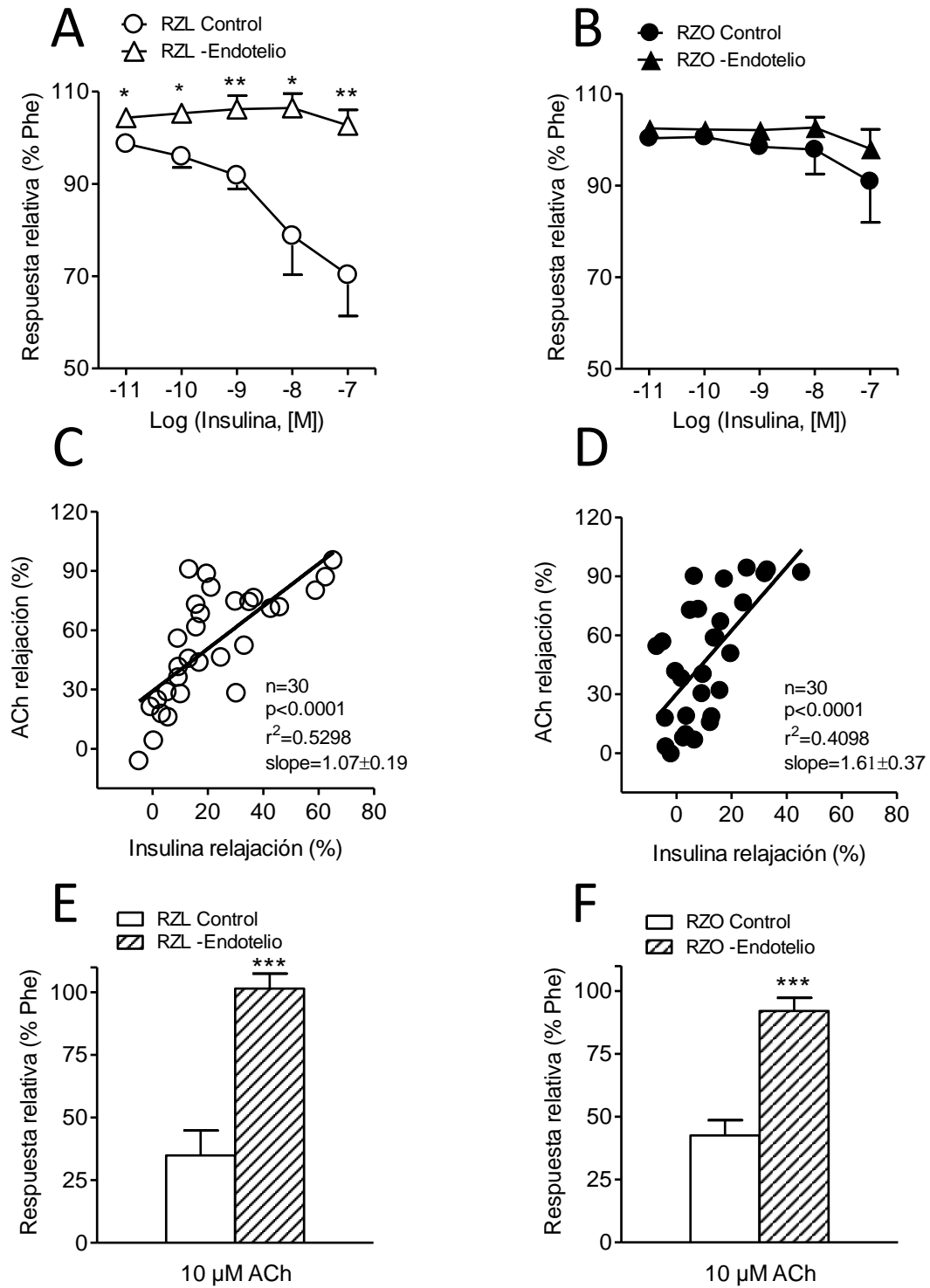
**Figura 18. Efecto de la insulina sobre el calcio y la tensión en las arterias penneas de RZL y RZO.** Registros simultáneos de  $[Ca^{2+}]_i$  (A y C arriba) y de tensión (A y C abajo) que muestran el efecto de una dosis única de insulina (0.1  $\mu M$ ) y de ACh (10  $\mu M$ ) sobre arterias penneas de RZL (A) y RZO (C) precontraídas con Phe (1  $\mu M$ ). Las relajaciones se acompañaron de una disminución de  $[Ca^{2+}]_i$  en RZL, y ambas respuestas se encontraron alteradas en RZO (C y D). (B, D) Media de los efectos a la insulina y ACh sobre los incrementos en  $[Ca^{2+}]_i$  y tensión inducidos por Phe en arterias de RZL (B) y RZO (D). Los datos se expresan como media  $\pm$  ESM de 5-7 arterias, 1 por animal. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs RZL, utilizando un test de la *t* de Student no pareado.

### 3.3. Papel del endotelio en las respuestas relajantes de la insulina en las arterias peneanas de RZL y de RZO

Con objeto de evaluar la implicación del endotelio en las respuestas inducidas por la insulina, se procedió a la retirada mecánica del mismo. Este procedimiento inhibió la respuesta vasodilatadora inducida por la hormona en las arterias peneanas de RZL y RZO. Los valores de relajación máxima fueron  $29.7 \pm 8.9 \%$  en RZL con endotelio, y  $-2.7 \pm 3.3 \%$  sin endotelio ( $P < 0.01$ ) (Figura 19A) y  $9.1 \pm 9.0$  en RZO con endotelio, y  $2.2 \pm 4.2 \%$  sin endotelio (Figura 19B).

Así mismo, se observó que existía una correlación lineal positiva entre las relajaciones inducidas por la insulina ( $0.1 \mu\text{M}$ ) y las relajaciones inducidas por el agonista endotelial ACh ( $10 \mu\text{M}$ ), tanto en arterias peneanas de RZL (Figura 19C) como de RZO (Figura 19D).

La ausencia funcional de endotelio tras la retirada mecánica del mismo se verificó por la ausencia de efecto vasodilatador de la ACh (Figura 19E y F). Los valores de relajación máximos a la ACh en RZL fueron  $64.0 \pm 11.9\%$  y  $-1.5 \pm 6.0\%$  ( $P < 0.0001$ ,  $n=6-7$ ) en arterias con y sin endotelio, respectivamente, y en RZO de  $62.3 \pm 6.4\%$  y de  $7.9 \pm 5.2\%$  ( $P < 0.0001$ ,  $n=6-8$ ) en arterias con y sin endotelio, respectivamente.

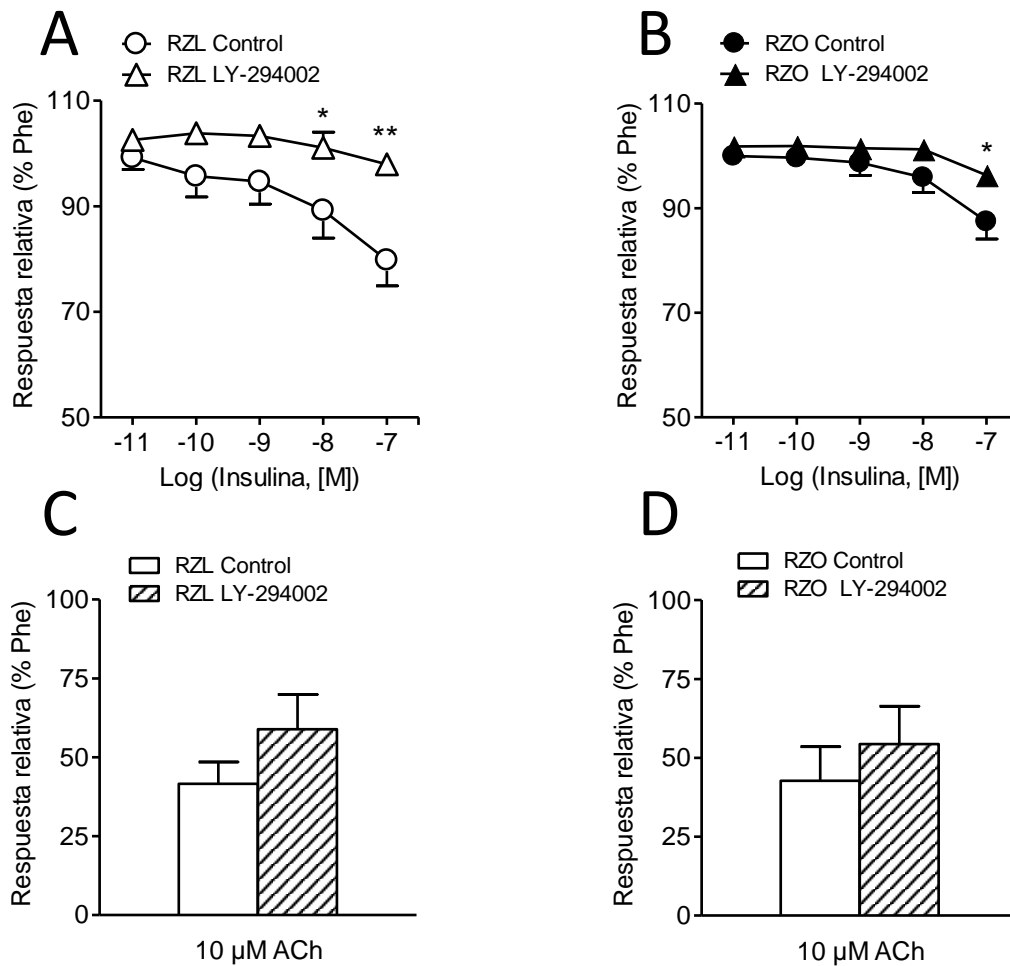


**Figura 19. Efecto de la retirada del endotelio sobre la relajación inducida por insulina en arterias penenanas de RZL y RZO.** (A y B) Respuesta relajante media a la insulina en arterias penenanas con endotelio intacto y sin endotelio de RZL (A) y de RZO (B). (C y D) Existe una correlación lineal positiva entre las relajaciones inducidas por insulina y por ACh tanto en RZL (C) como en RZO (D). (E y F) Respuestas relajantes medias a la ACh (10 μM) en arterias penenanas con y sin endotelio de RZL (E) y de RZO (F). Los datos se expresan como media ± ESM de 6-7 arterias (A, B, E y F) y de 30 arterias (C y D), 1-2 por animal. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.0001 vs arterias con endotelio intacto, utilizando un test de la *t* de Student no pareado.

### 3.4. Papel de la vía de PI3K/Akt/eNOS en la respuesta vascular a la insulina de las arterias peneanas de RZL y RZO

#### 3.4.1. Efecto de la inhibición de la PI3K

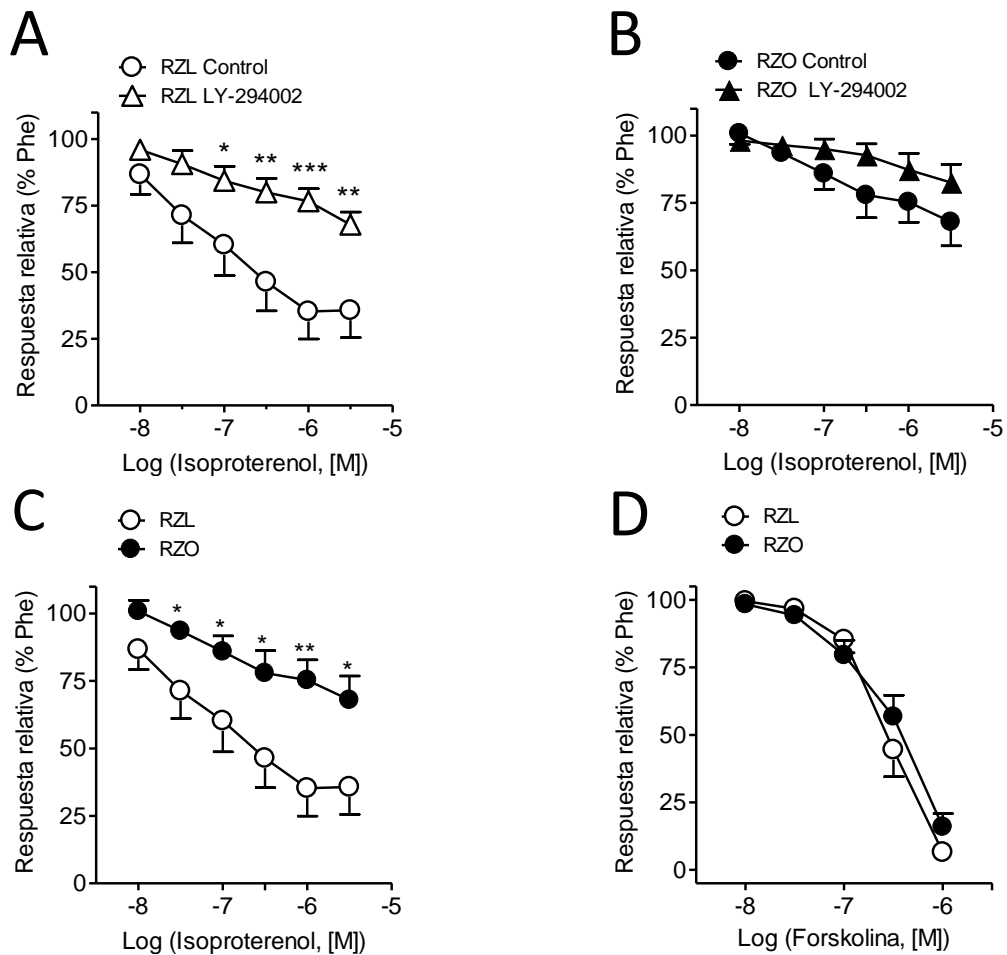
Con el objeto de evaluar la implicación de la vía PI3K/Akt en la respuesta relajante inducida por la insulina en las arterias peneanas de RZL y RZO, se utilizó el inhibidor de la PI3K LY-294002 (3  $\mu$ M). El tratamiento con el mismo redujo significativamente el efecto relajante de la insulina en arterias de RZL y de RZO (Figura 20A y B). Así, las respuestas máximas en presencia de LY-294002 fueron  $2.0 \pm 1.5$  ( $P < 0.0001$  vs control,  $n=7$ ) y  $3.7 \pm 0.9$  ( $P < 0.01$  vs control,  $n=8$ ) para RZL y RZO, respectivamente. El tratamiento con LY-294002 no modificó las respuestas relajantes a la ACh ni en RZL y en RZO (Figura 20C y D).



**Figura 20. Efecto del inhibidor de PI3K sobre la respuesta relajante inducida por la insulina en arterias peneanas de RZL y RZO.** (A y B) El inhibidor de PI3K LY-294002 (3  $\mu$ M), disminuyó las respuestas relajantes inducidas por la insulina en arterias peneanas de RZL (A) y de RZO (B). (C y D) El LY-294002 no alteró las respuestas relajantes a la ACh ni en RZL (C) ni en RZO (D). Los datos se expresan como media  $\pm$  ESM de 7-8 arterias, 1-2 por animal. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs control, utilizando un test de la *t* de Student no pareado.

De forma interesante, el inhibidor de PI3K también redujo la respuesta relajante inducida por el isoproterenol, agonista de los receptores adrenérgicos  $\beta$ , en las arterias peneanas de RZL, pero no en RZO (Figura 21A y B). Además, la respuesta relajante máxima al isoproterenol fue significativamente menor en arterias de RZO en comparación con RZL, siendo sus relajaciones máximas respectivas de  $32.0 \pm 8.9\%$  ( $n=12$ ) y  $64.3 \pm 10.2\%$  ( $n=10$ ) ( $P<0.05$ ) (Figura 21C).

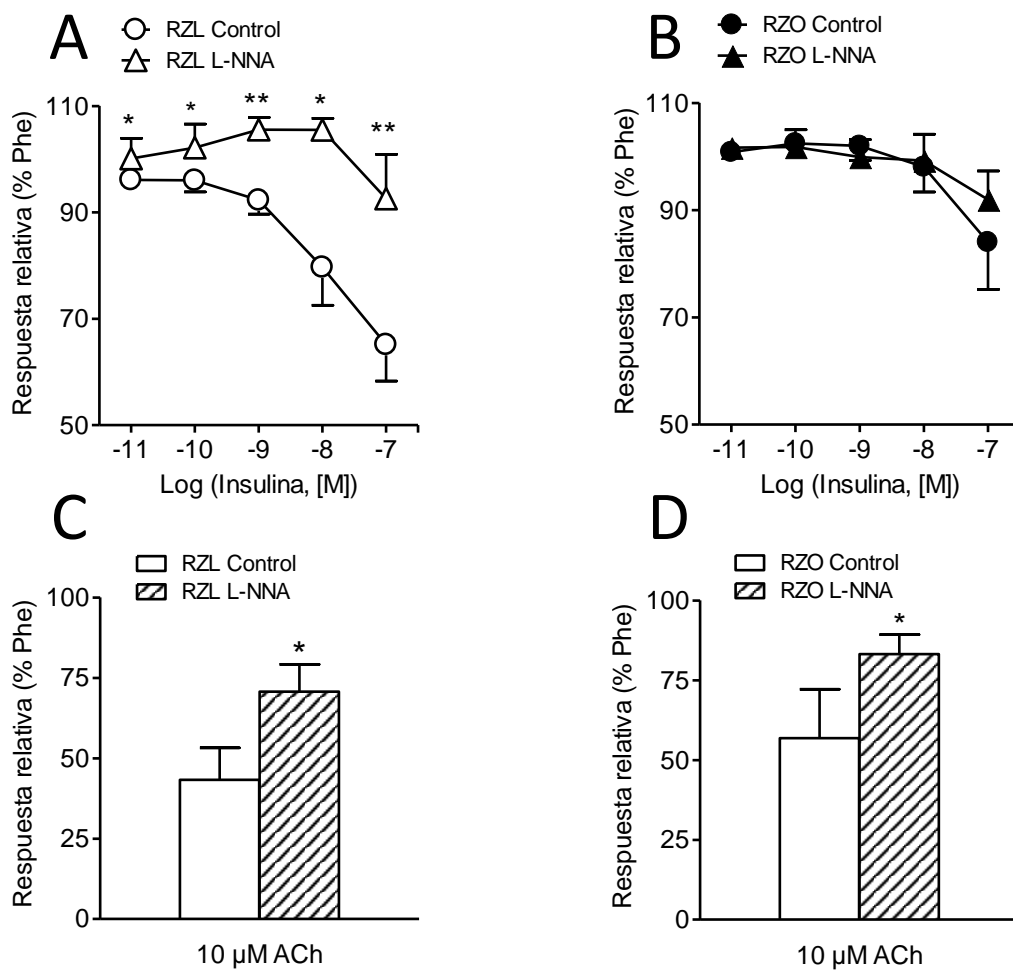
Con el propósito de comprobar si dicha alteración podía tener origen en un defecto de la vía de la adenilato ciclasa/AMPC, se estudió la respuesta de la forskolina, un activador de la adenilato ciclasa. Sin embargo, no se encontraron diferencias entre las respuestas relajantes inducidas por este agente entre las arterias peneanas de RZL y RZO (Figura 21D).



**Figura 21. Efecto del isoproterenol y la forskolina en las arterias peneanas de RZL y RZO.** (A y B) El inhibidor de la PI3K LY-294002 (3  $\mu$ M), redujo las respuestas relajantes inducidas por el agonista de  $\beta$ -adrenoceptores isoproterenol en las arterias peneanas de RZL (A), pero no de RZO (B). (C) La respuesta relajante al isoproterenol se encuentra alterada en arterias de RZO con respecto a RZL. (D) La vía de AMPC no se encuentra alterada en arterias peneanas de RZO como demuestra la respuesta relajante íntegra a la forskolina. Los datos se expresan como media  $\pm$  ESM de 10-15 arterias, 1-2 por animal. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.0001$ , utilizando test de la *t* de Student no pareado.

### 3.4.2. Efecto de la inhibición de la NOS

Con el objeto de evaluar la implicación de la vía de la eNOS/NO en la respuesta inducida por la insulina en las arterias peneanas de RZL y RZO, se utilizó L-NNA (100  $\mu$ M), un inhibidor competitivo de la NOS. Este bloqueante produjo una disminución significativa de la vasodilatación a la insulina en RZL, poniendo de manifiesto la participación de la NOS en dicha respuesta, aunque no en arterias de RZO (Figura 22A y B). La efectividad del tratamiento se comprobó por la disminución de la relajación a la ACh (10  $\mu$ M) tras el bloqueo de la NOS (Figura 22C y D).

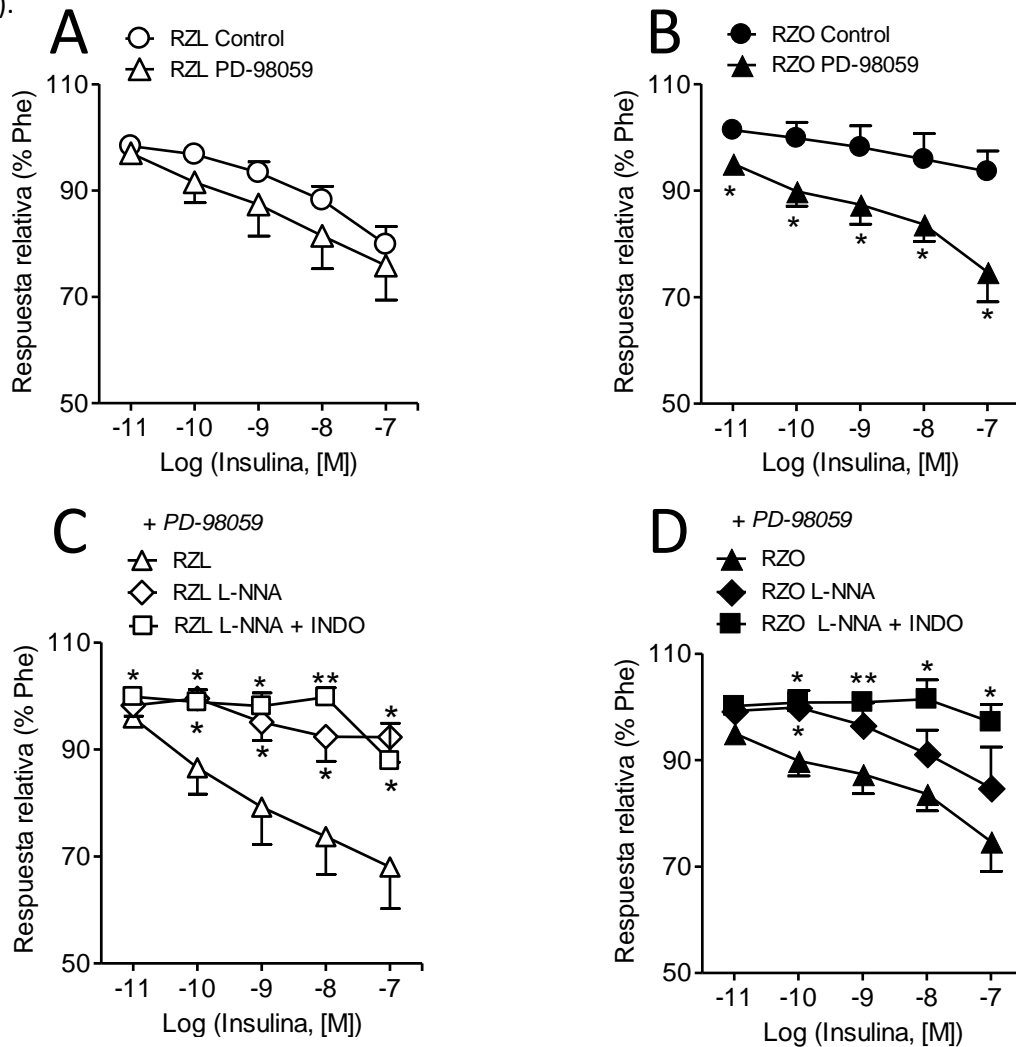


**Figura 22. Efecto de la inhibición de la NOS sobre las respuestas relajantes a la insulina y ACh en arterias peneanas de RZL y RZO.** (A y B) La L-NNA (100  $\mu$ M), inhibidor de NOS, disminuyó la respuesta relajante a la insulina en arterias peneanas de RZL (A), pero no de RZO (B). (C y D). La vasodilatación dependiente del endotelio inducida por ACh se vio alterada por la inhibición de NOS tanto en RZL (C) como en RZO (D). Los datos se expresan como media  $\pm$  ESM de 6-8 arterias, 1-2 por animal. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs arterias control, utilizando un test de la *t* de Student no pareado.

### 3.5. Papel de la vía de MAPK en la respuesta vascular a la insulina de las arterias peneanas de RZL y RZO

#### 3.5.1. Efecto de la inhibición de la MAPK

El PD-98059 (5  $\mu$ M), un inhibidor de la ERK MAPK, no modificó la vasodilatación inducida por la insulina en las arterias de RZL (Figura 23A), pero produjo un incremento significativo de la misma en RZO (Figura 23B). Con objeto de averiguar la procedencia del compuesto implicado en dicha relajación desenmascarada en animales obesos, se probaron otros inhibidores en presencia de de PD-98059. En RZL, la respuesta fue inhibida con L-NNA (Figura 23C), mientras que en RZO se inhibió sólo en presencia de L-NNA e indometacina simultáneamente, poniendo de manifiesto así la implicación de NO y prostanoideos (Figura 23D).

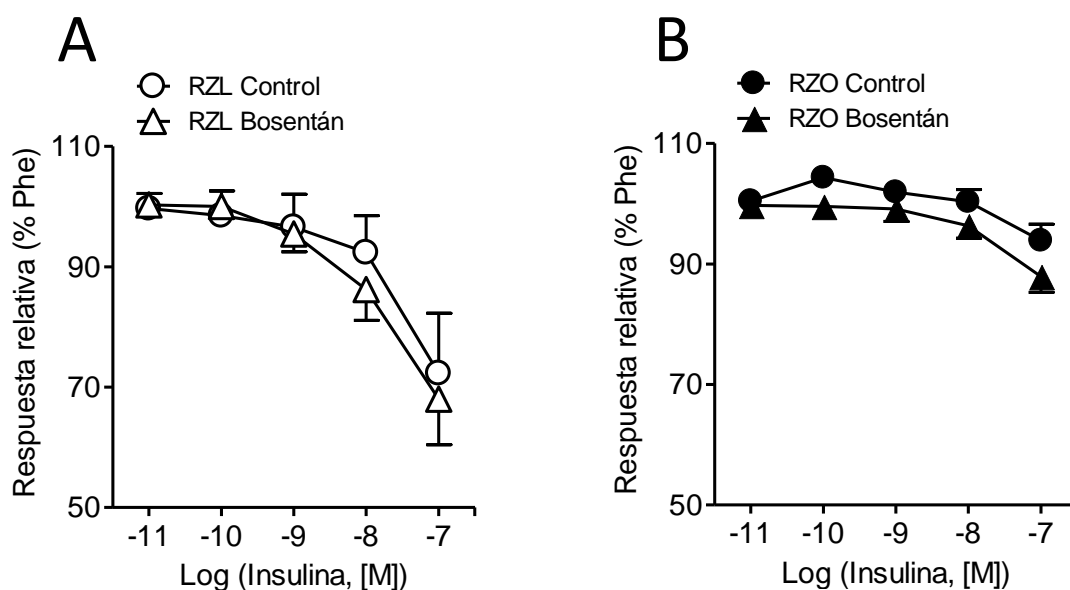


**Figura 23. Efecto de la inhibición de MAPK sobre las respuestas a la insulina en arterias peneanas de RZL y RZO.** (A y B) LA inhibición de MAPK con PD-98059 no modificó la relajación a la insulina de RZL (A), sin embargo la potenció en RZO. (C, D) Efecto de la inhibición de NOS y de ciclooxygenasa en la respuesta a la insulina de arterias peneanas de RZL y RZO tratadas con PD-98059. Los datos se expresan como media  $\pm$  ESM de 6-12 arterias, 1-2 por animal. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs arterias control, utilizando test de la *t* de Student no pareado (A y B) o one-way ANOVA (C y D).



### 3.5.2. Efecto de la inhibición de los receptores de ET-1

El antagonista no selectivo de los receptores de ET-1, bosentán (10  $\mu$ M), no modificó las respuestas relajantes a la insulina en arterias peneanas de RZL ni de RZO (Figura 24A y B). Sin embargo, el bosentán inhibió las contracciones inducidas por ET-1 en ambos grupos de animales. (Ver apartado 3.6.4.1.).



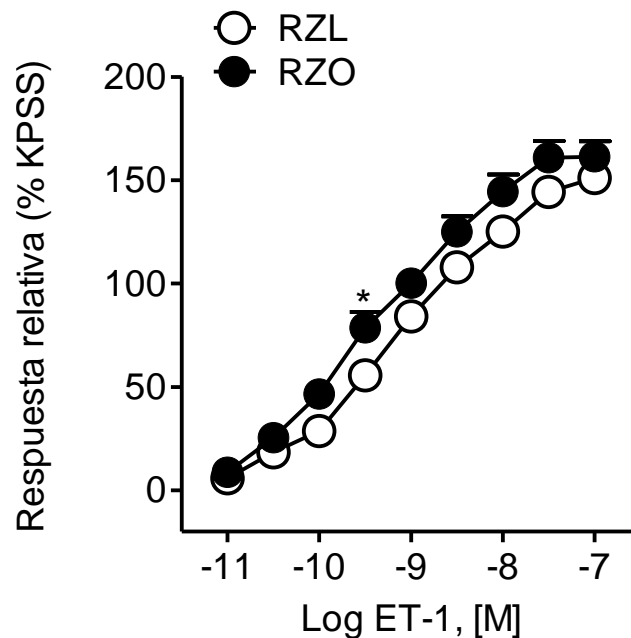
**Figura 24. Efecto de la inhibición de los receptores de ET-1 sobre la respuesta inducida por la insulina en arterias peneanas de RZL y RZO. (A y B).** El bosentán no modificó las respuestas relajantes a la insulina en arterias de RZL (A) ni de RZO (B). Los datos se expresan como media  $\pm$  ESM de 6-11 arterias, 1-2 por animal.

### 3.6. Caracterización de la respuesta vasoconstrictora a la ET-1 en las arterias penenanas de RZL y RZO

Debido a la implicación de la ET-1 en las vías de señalización de la insulina en el endotelio arterial, y ya que sus acciones vasoactivas no ha sido caracterizados en las arterias penenanas, el paso siguiente del estudio fue evaluar los efectos vasculares de la ET-1 sobre la tensión y la  $[Ca^{2+}]_i$  así como la caracterización de los receptores responsables de sus efectos en el lecho vascular penenano de animales sanos y de la RZO como modelo animal de prediabetes/Síndrome Metabólico.

#### 3.6.1. Efecto de la ET-1 sobre la tensión de las arterias penenanas de RZL y RZO

La ET-1 exógena indujo una vasoconstricción de similar magnitud en las arterias penenanas de RZL y RZO (Figura 25). Los valores de  $pD_2$  fueron de  $9.13 \pm 0.10$  y de  $9.34 \pm 0.09$ , respectivamente, y las respuestas máximas expresadas como porcentaje de la contracción inducida por KPSS, fueron de  $151.1 \pm 5.0\%$  en RZL y de  $161.3 \pm 7.6\%$  en RZO ( $n=37-38$  arterias).



**Figura 25.** La ET-1 induce vasoconstricción similar en arterias penenanas de RZL y RZO. Los datos se expresan como media  $\pm$  ESM de 37-38 arterias, 1-2 por animal.

### 3.6.2. Efecto de la ET-1 y del U46619 sobre la $[Ca^{2+}]_i$ de arterias penenanas de RZL y RZO

Se determinaron de forma simultánea las variaciones en la  $[Ca^{2+}]_i$  y en la tensión en respuesta a la ET-1 en arterias penenanas de RZL y RZO. Previamente a la realización de la CCR de ET-1 se realizó una contracción de 3 minutos con una solución rica en  $K^+$  (Tabla 4).

**Tabla 4. Efecto de la despolarización con KPSS sobre la  $[Ca^{2+}]_i$  y la tensión de las arterias penenanas de RZL y RZO**

	RZL	n	RZO	n
$l_1 (\mu m)$	$157 \pm 8$	19	$135 \pm 7^*$	21
$[Ca^{2+}]_i (\Delta F_{340}/F_{380})$	$0.43 \pm 0.05$	21	$0.35 \pm 0.02$	19
Tensión ( $Nm^{-1}$ )	$1.95 \pm 0.20$	19	$1.07 \pm 0.10^{***}$	21

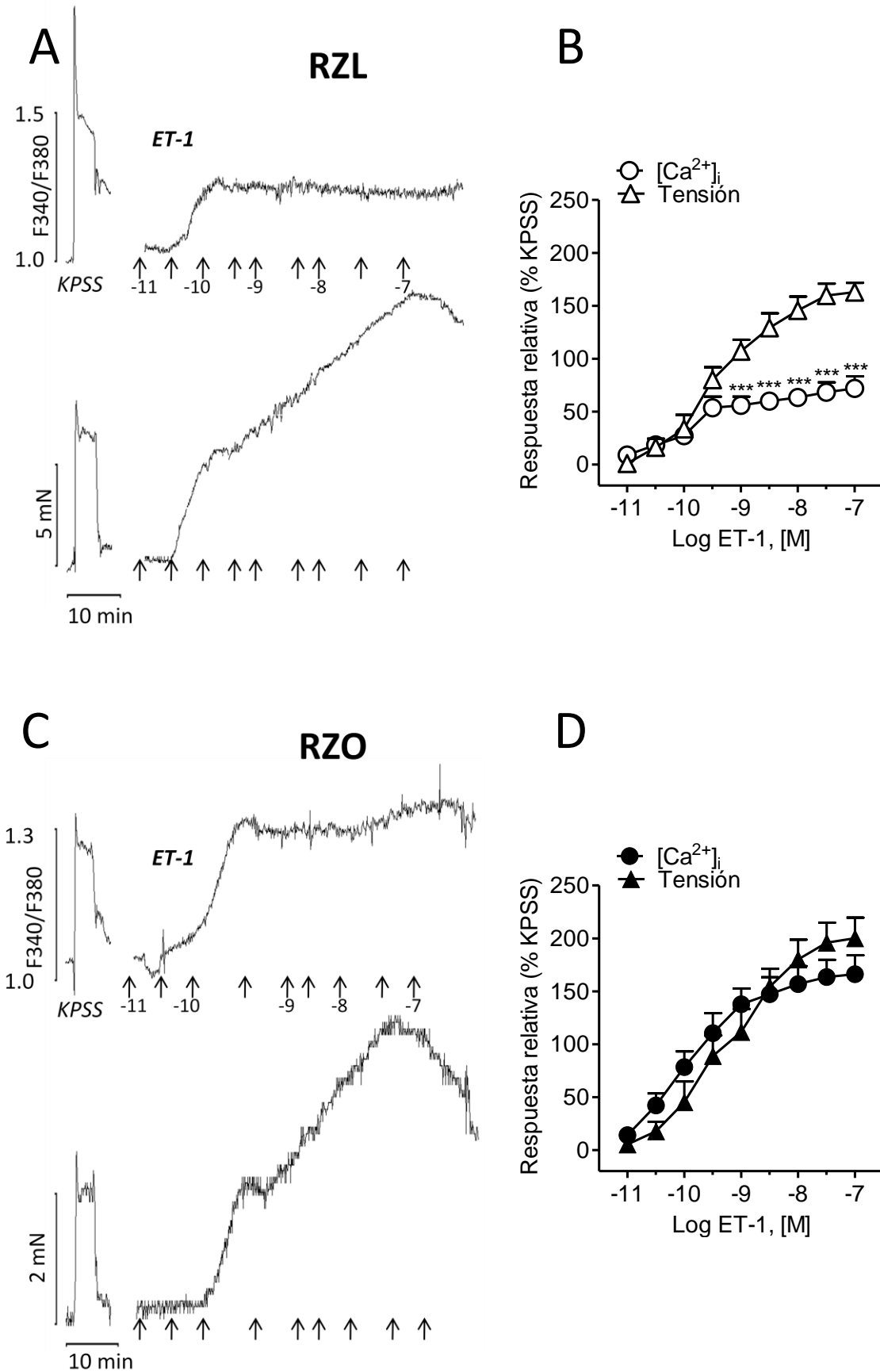
Los datos se expresan como media  $\pm$  ESM de n número de arterias, 1 por animal. Las diferencias fueron analizadas utilizando test de la *t de Student* no pareado. \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.0001$  vs RZL.

#### 3.6.2.1. Efecto de la ET-1 sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en arterias penenanas de RZL y RZO

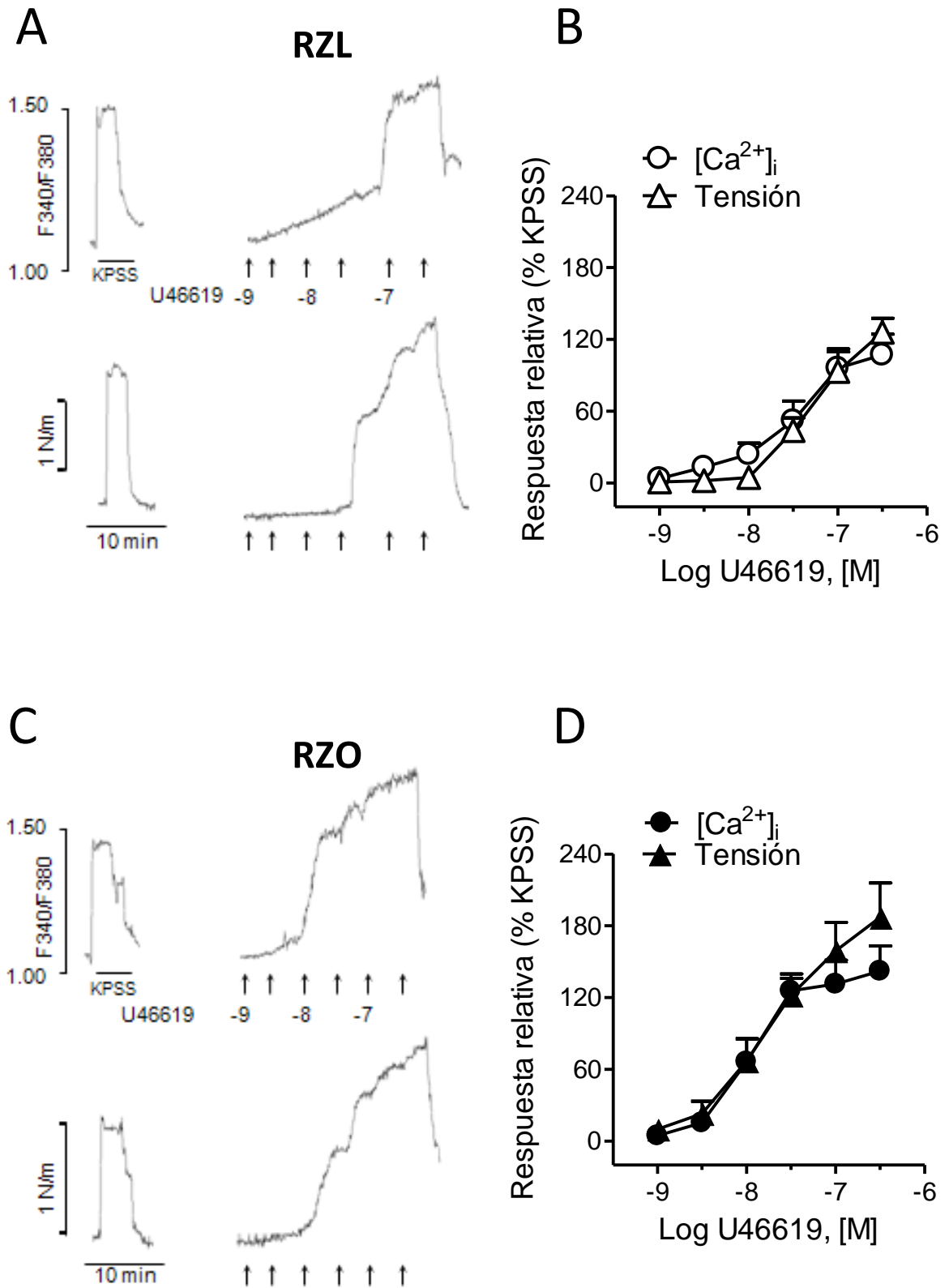
En arterias penenanas de RZL la concentración de ET-1 se asoció con la entrada de calcio a bajas dosis, mientras que a dosis altas se produjo un desarrollo de fuerza no acompañada de incrementos en la  $[Ca^{2+}]_i$ , indicando mecanismos de sensibilización al  $Ca^{2+}$  (Figure 26A y B). En arterias penenanas de RZO, la vasoconstricción estuvo levemente incrementada con respecto a los controles, y se acompañó de un incremento manifiesto en la elevación de  $[Ca^{2+}]_i$  (Figura 26C, D y Figura 28A y B).

#### 3.6.2.2. Efecto del U46619 sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en arterias penenanas de RZL y RZO

La contracción producida por el agonista del receptor de tromboxano (TP), el U46619, estuvo acompañada por un incremento simultáneo en la  $[Ca^{2+}]_i$  en las arterias penenanas de RZL (Figura 27A y B). En arterias de RZO, la elevación de  $[Ca^{2+}]_i$  y la vasoconstricción inducida por este agonista, estuvieron significativamente incrementadas en comparación con arterias de RZL, tanto su sensibilidad, como su respuesta máxima (Figura 27C y D y Figura 28 C y D).

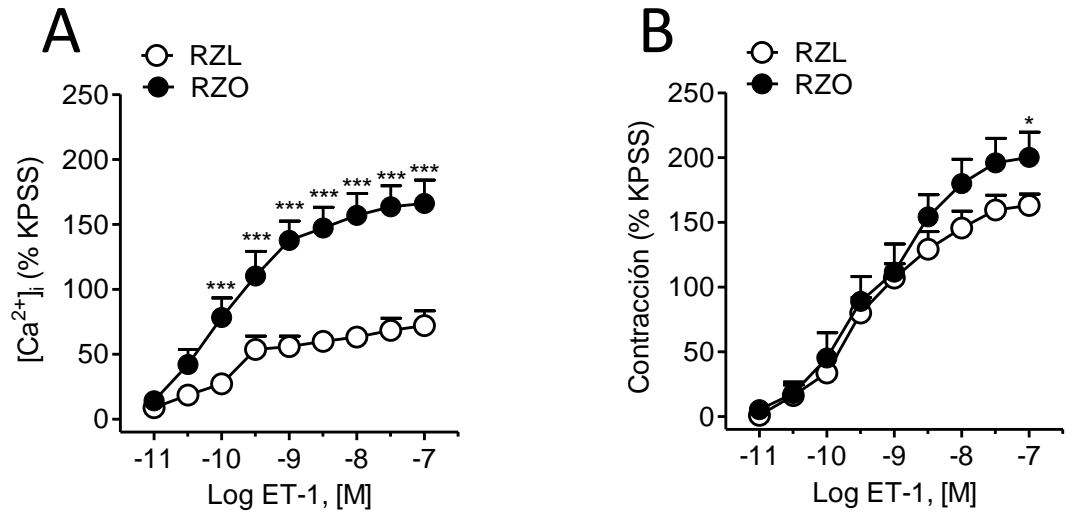


**Figura 26. Efecto de la ET-1 sobre el calcio y la tensión de las arterias peneanas de RZL y RZO.** Registros simultáneos de la  $[Ca^{2+}]_i$  (A y C, arriba) y de la tensión (A y C, abajo) que muestran el efecto de la ET-1 sobre arterias peneanas de RZL (A) y RZO (C). Los datos se expresan como media  $\pm$  ESM de 8-9 arterias, 1 por animal.

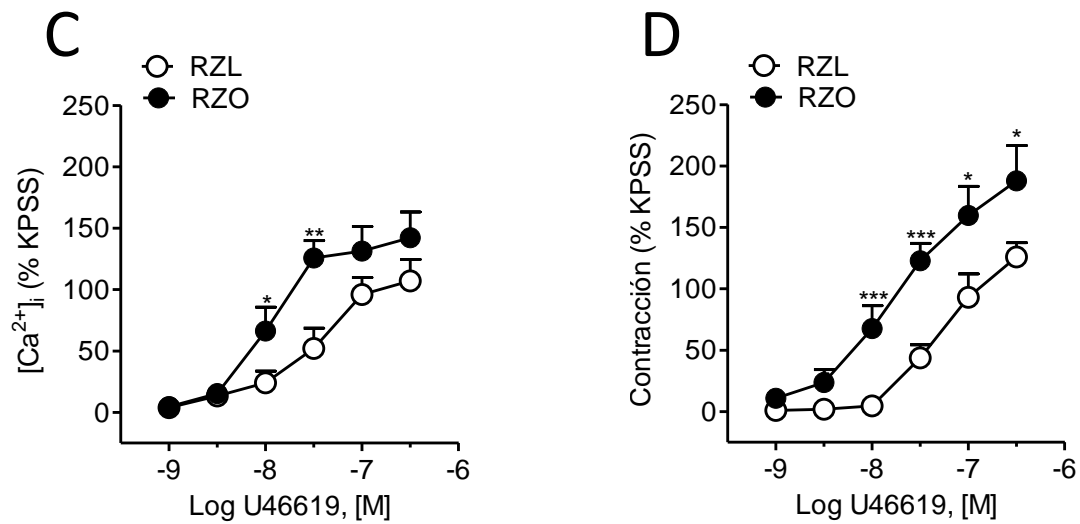


**Figura 27. Efecto del agonista del receptor TP, U46619 sobre el calcio y la tensión de las arterias peneanas de RZL y RZO.** Registros simultáneos de la  $[Ca^{2+}]_i$  (A y C, arriba) y de la tensión (A y C, abajo) que muestran el efecto del U46619 sobre arterias peneanas de RZL (A) y RZO (C). Los datos se expresan como media  $\pm$  ESM de 7-8 arterias, 1 por animal.

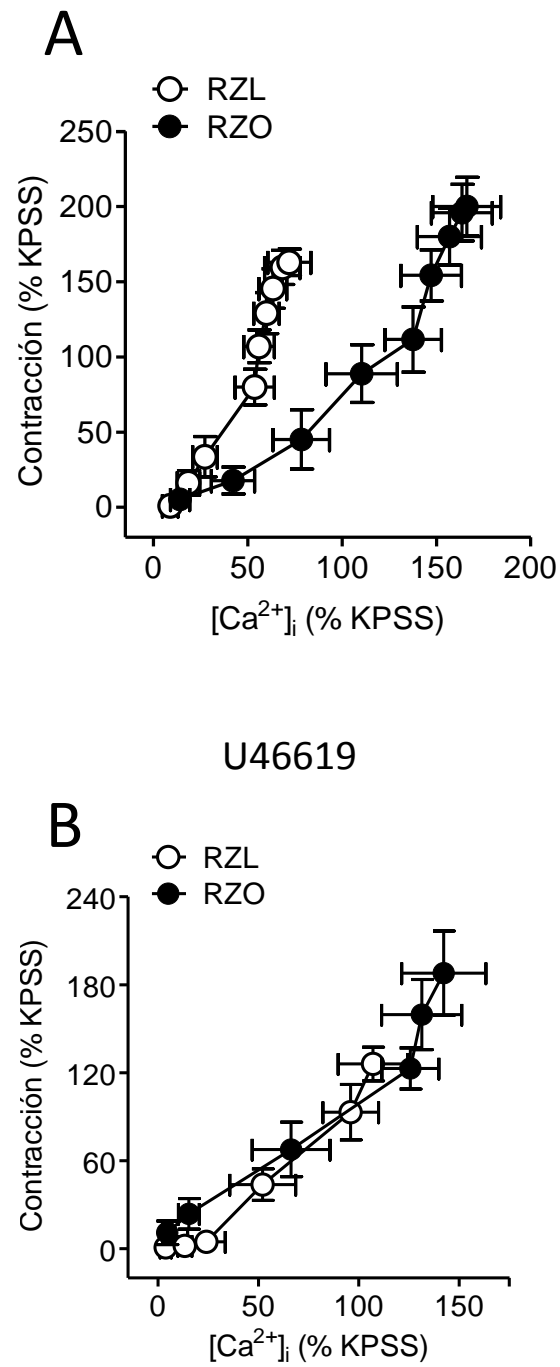
## ET-1



## U46619



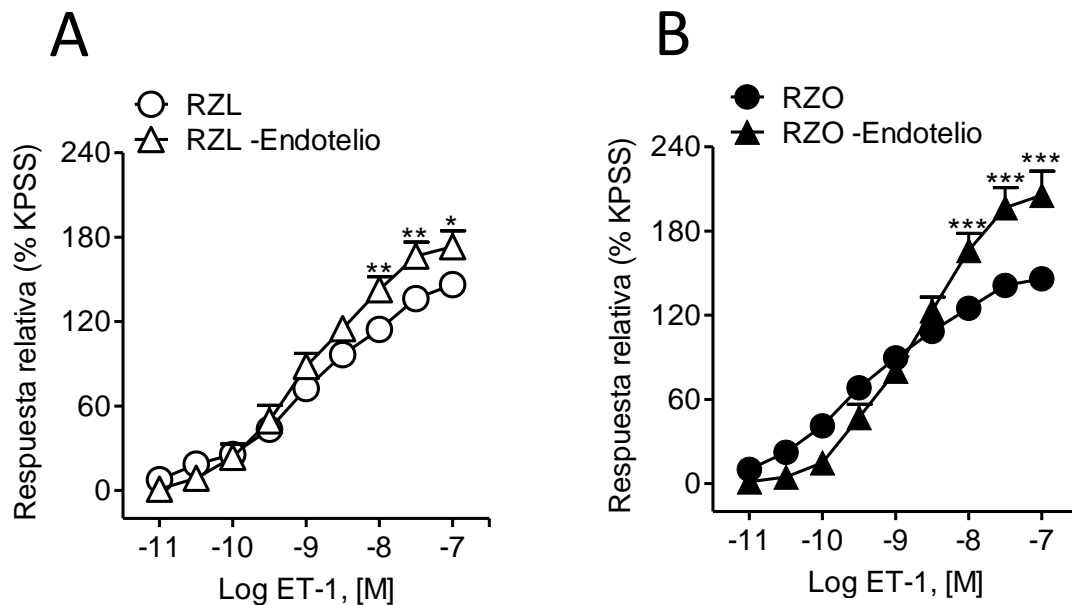
**Figura 28.** Efectos de la ET-1 (A y B) y el U46619 (C y D) sobre la  $[Ca^{2+}]_i$  (A y C) y la tensión (B y D) de las arterias peneanas de RZL y RZO de forma comparativa. La ET-1 induce una contracción ligeramente mayor en arterias de RZO que de RZL, mientras que la diferencia en el incremento de  $[Ca^{2+}]_i$  es muy superior en RZO vs RZL. El análogo del  $TxA_2$ , U46619, induce mayor contracción en las arterias peneanas de RZO que de RZL, lo que se corresponde con incrementos proporcionales de la  $[Ca^{2+}]_i$ . Los datos se expresan como media  $\pm$  ESM de 7-9 arterias, 1 por animal.



**Figura 29.** Relación entre la  $[Ca^{2+}]_i$  y la tensión en las respuestas inducidas por la ET-1 (A) y el análogo del TxA2 U46619 (B) en las arterias penéneas de RZL y de RZO. Los datos se expresan como media  $\pm$  ESM de 7-9 arterias, 1 por animal.

### 3.6.3. Papel del endotelio en la contracción inducida por ET-1 en las arterias penenanas de RZL y de RZO

La retirada mecánica del endotelio produjo una potenciación de la contracción máxima inducida por ET-1 en las arterias penenanas, más pronunciada en el caso de las arterias de RZO (Figura 28A y B), desenmascarando así un factor relajante liberado por la ET-1 del endotelio vascular, cuya liberación está incrementada en animales con Síndrome Metabólico.



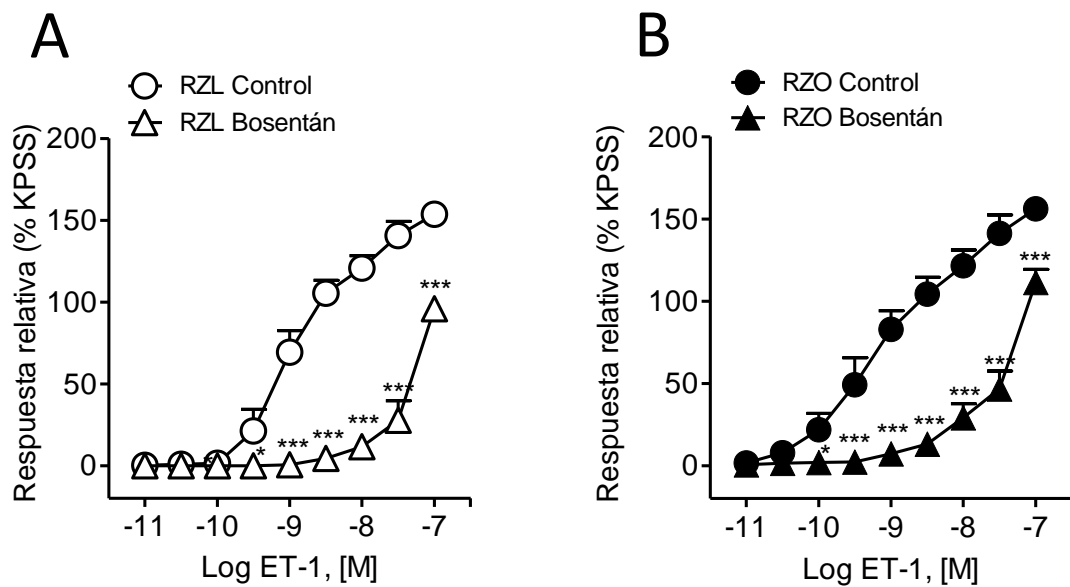
**Figura 30. Efecto de la retirada mecánica del endotelio sobre la contracción inducida por ET-1 en arterias penenanas de RZL (A) y RZO (B).** Los datos se expresan como media  $\pm$  ESM de 10-28 arterias, 1-2 por animal. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.0001$  vs arterias control con endotelio intacto, utilizando un test de la *t de Student* test de la *t de Student* no pareado para cuantificar las diferencias.



### 3.6.4. Efecto de la inhibición de los receptores de ET-1

#### 3.6.4.1. Inhibición no selectiva de los receptores de ET-1

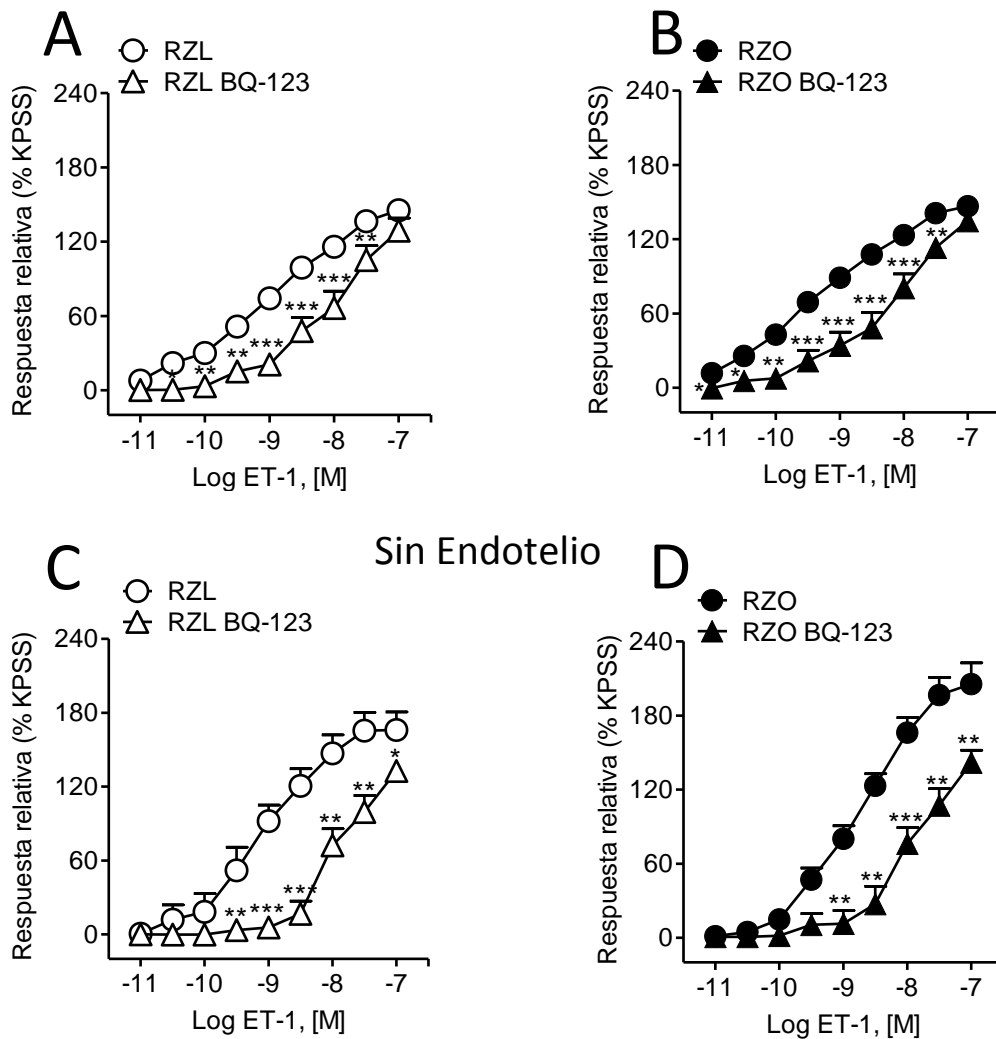
El antagonista no selectivo de los receptores de ET-1, bosentán (5  $\mu$ M), inhibió significativamente las respuestas contráctiles inducidas por ET-1 en las arterias peneanas de RZL (Figura 31A) y de RZO (Figura 31B). Los valores de  $pD_2$  fueron de  $8.94 \pm 0.13$  (n=8) vs  $7.23 \pm 0.12$  (n=10),  $P<0.0001$ , en arterias de RZL control y tratadas, respectivamente; y de  $9.20 \pm 0.34$  (n=7) vs  $7.23 \pm 0.11$  (n=12),  $P<0.01$ , en arterias de RZO control y tratadas respectivamente.



**Figura 31. Efecto del bosentán sobre las contracciones inducidas por ET-1 en arterias peneanas de (A) RZL y (B) RZO.** Los datos se expresan como media  $\pm$  ESM de 7-12 arterias, 1-2 por animal.

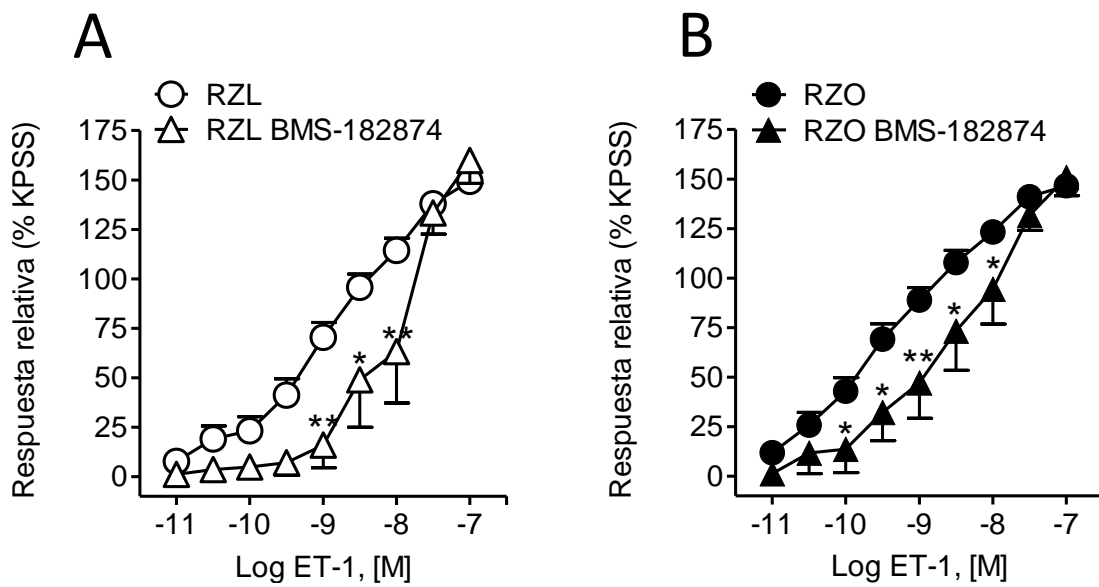
3.6.4.2. *Implicación de los receptores ET<sub>A</sub> en la respuesta contráctil inducida por ET-1 en arterias peneanas de RZL y RZO*

La inhibición de los receptores ET<sub>A</sub> con BQ-123 (10  $\mu$ M) produjo un desplazamiento hacia la derecha de la curva de ET-1 tanto en arterias peneanas de RZL como de RZO (Figura 32A y B), poniendo de manifiesto que la acción vasoconstrictora de la ET-1 está mediada en parte a través de estos receptores. Con objeto de determinar la localización de los receptores ET<sub>A</sub>, bien a nivel muscular o bien a nivel endotelial, se realizaron CCR de ET-1 en presencia de BQ-123 en arterias desprovistas de endotelio. El BQ-123 también inhibió la repuesta contráctil de la ET-1, desplazando las CCR hacia la derecha (Figura 32B y C), lo que sugiere que los receptores ET<sub>A</sub> implicados en la respuesta contráctil se encuentran ubicados a nivel muscular, ya que la inhibición se mantiene en arterias desprovistas de endotelio.



**Figura 32.** Efecto de la inhibición de los receptores ET<sub>A</sub> en arterias peneanas (A y B) con endotelio intacto y (B y C) desprovistas de endotelio de RZL y RZO. Los datos se expresan como media  $\pm$  ESM de 6-12 arterias, 1-2 por animal. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.0001 vs arterias control sin tratar.

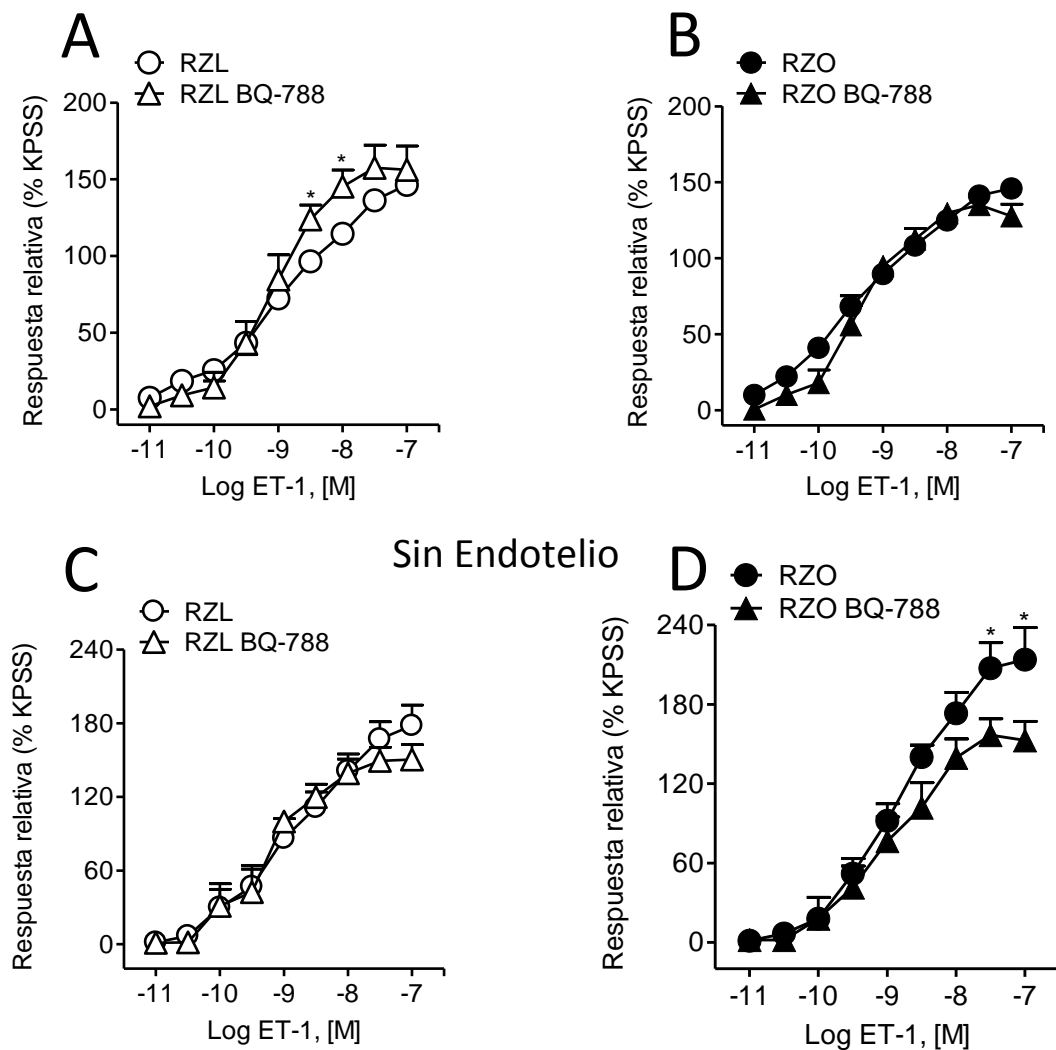
Otro antagonista diferente de los receptores de endotelina  $ET_A$ , el BMS-182874, inhibió competitivamente la respuesta contráctil a la ET-1 en arterias peneanas de animales sanos y de animales obesos, desplazando la curva concentración respuesta a la derecha sin modificar la respuesta contráctil máxima. Los  $pD_2$  fueron de  $9.0 \pm 0.1$  y de  $7.9 \pm 0.3$  para arterias de RZL control y tratadas, respectivamente ( $P < 0.01$ ,  $n=7$ ), y en arterias de RZO fueron de  $9.3 \pm 0.1$  y de  $8.4 \pm 0.3$  para control y tratadas respectivamente ( $P < 0.05$ ,  $n=8$ ).



**Figura 33.** Efecto de la inhibición de los receptores  $ET_A$  con BMS-182874 en arterias peneanas de RZL (A) y RZO (B). Los datos se expresan como media  $\pm$  ESM de 7-8 arterias, 1-2 por animal. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , vs arterias control sin tratar.

### 3.6.4.3. Implicación de los receptores $ET_B$ en la respuesta contráctil inducida por ET-1 en arterias peneanas de RZL y RZO

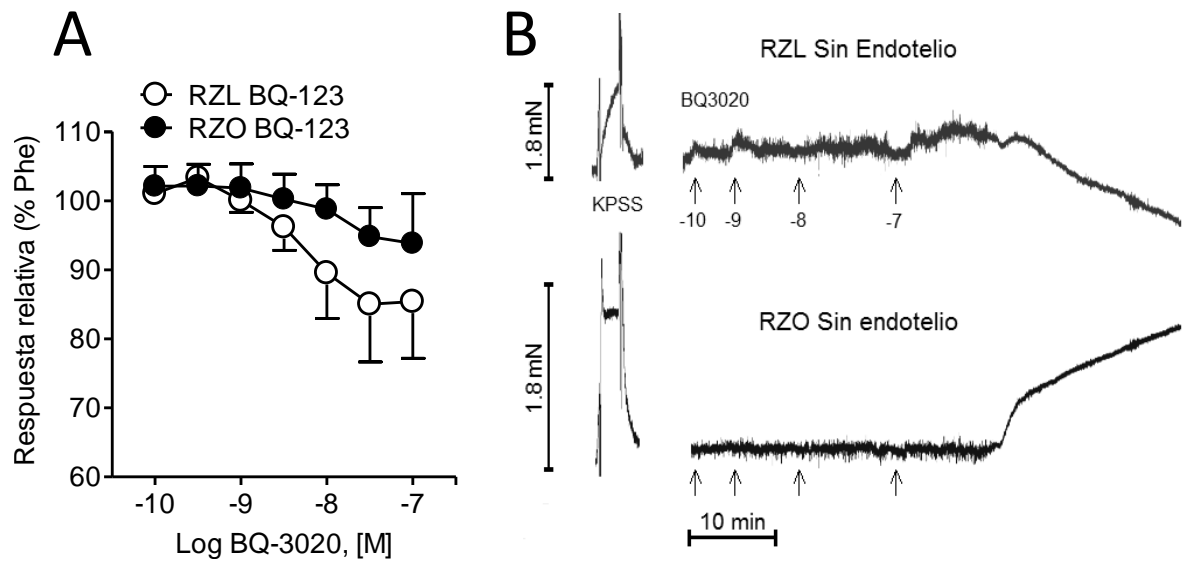
La inhibición de los receptores  $ET_B$  con BQ-788 (10  $\mu$ M) potenció modestamente la contracción inducida por ET-1 en RZL (Figura 34A), pero no en RZO (Figura 34B). Con objeto de localizar la posible presencia de los receptores  $ET_B$ , se aplicó el tratamiento de BQ-788 también en arterias sin endotelio, lo que no modificó la respuesta en arterias de RZL con respecto a sus controles sin endotelio (Figura 34C), sugiriendo que el receptor  $ET_B$  relajante es de origen endotelial. Sin embargo, en arterias sin endotelio de animales obesos, el BQ-788 disminuyó la respuesta contráctil a la ET-1, desenmascarando un receptor  $ET_B$  contráctil en el músculo, probablemente neutralizado por la liberación de un factor relajante en arterias con endotelio intacto (Figura 34D).



**Figura 34.** Efecto de la inhibición de los receptores  $ET_B$  en en arterias peneanas (A y B) con endotelio intacto y (B y C) desprovistas de endotelio de RZL y RZO. Los datos se expresan como media  $\pm$  ESM de 6-12 arterias, 1-2 por animal. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.0001$  vs arterias control sin tratar.

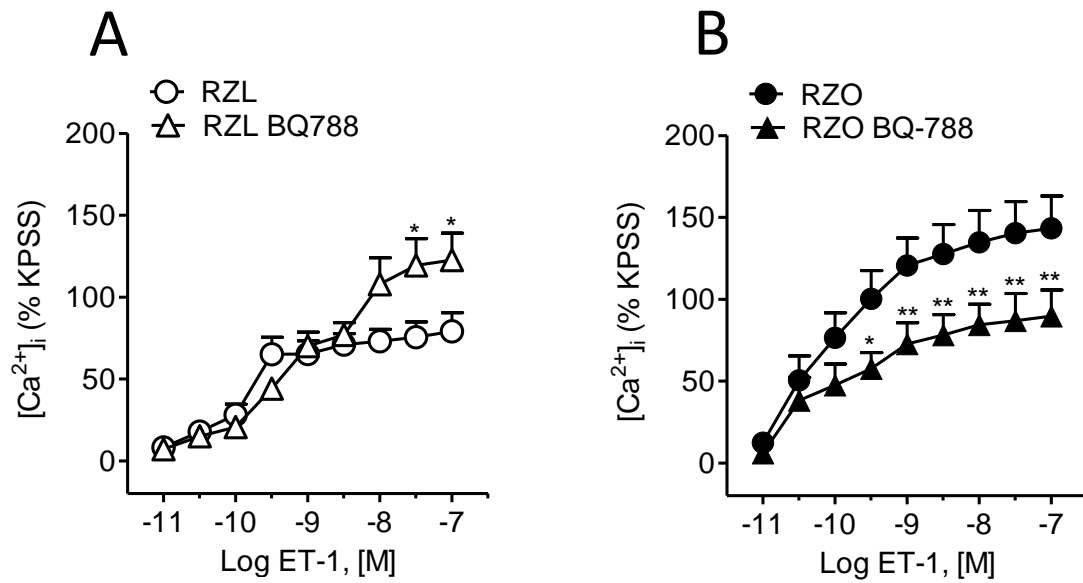
La presencia de receptores  $ET_B$  con efecto relajante se evaluó mediante la realización de curvas concentración-respuesta para el agonista  $ET_B$  BQ-3020 en arterias precontraídas con Phe y en presencia del antagonista de receptores  $ET_A$  BQ-123, para bloquear los efectos contráctiles mediados por  $ET_A$ . El BQ-3020 tuvo un efecto relajante modesto que fue más potente en arterias de RZL que de RZO (Figura 35A) aunque estas diferencias no alcanzaron la significación estadística debido a la variabilidad de dicho efecto.

Por otra parte, se evaluó también la presencia de receptores  $ET_B$  contráctiles, de localización muscular descrita en otros lechos vasculares, para lo cual se realizaron curvas para el agonista  $ET_B$  BQ-3020 sobre la tensión basal en arterias desprovistas de endotelio. El agonista de  $ET_B$ , BQ-3020 originó una contracción a la concentración más alta utilizada en arterias de animales obesos, mientras que no indujo contracción e incluso relajó sobre la línea base de animales control (Figura 35B).



**Figura 35. Efecto del agonista de los receptores  $ET_B$  BQ-3020. (A)** Efecto relajante del BQ-3020 en arterias peneanas de RZL y RZO con endotelio intacto y precontraídas con Phe en presencia del antagonista de los receptores  $ET_A$  BQ-123. Los datos se expresan como media  $\pm$  ESM de 11 arterias, 1-2 por animal. **(B)** Efecto del BQ-3020 sobre la tensión basal en arterias peneanas de RZL (arriba) y RZO (abajo) desprovistas de endotelio.

El antagonista de los receptores  $ET_B$  favoreció el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  inducido por ET-1 en arterias penenanas de RZL (Figura 36A), sin embargo la inhibió en las arterias de animales obesos (Figura 36B), poniendo de manifiesto la participación de los receptores  $ET_B$  en la mayor entrada de  $Ca^{2+}$  que induce la ET-1 bajo condiciones de Síndrome Metabólico.

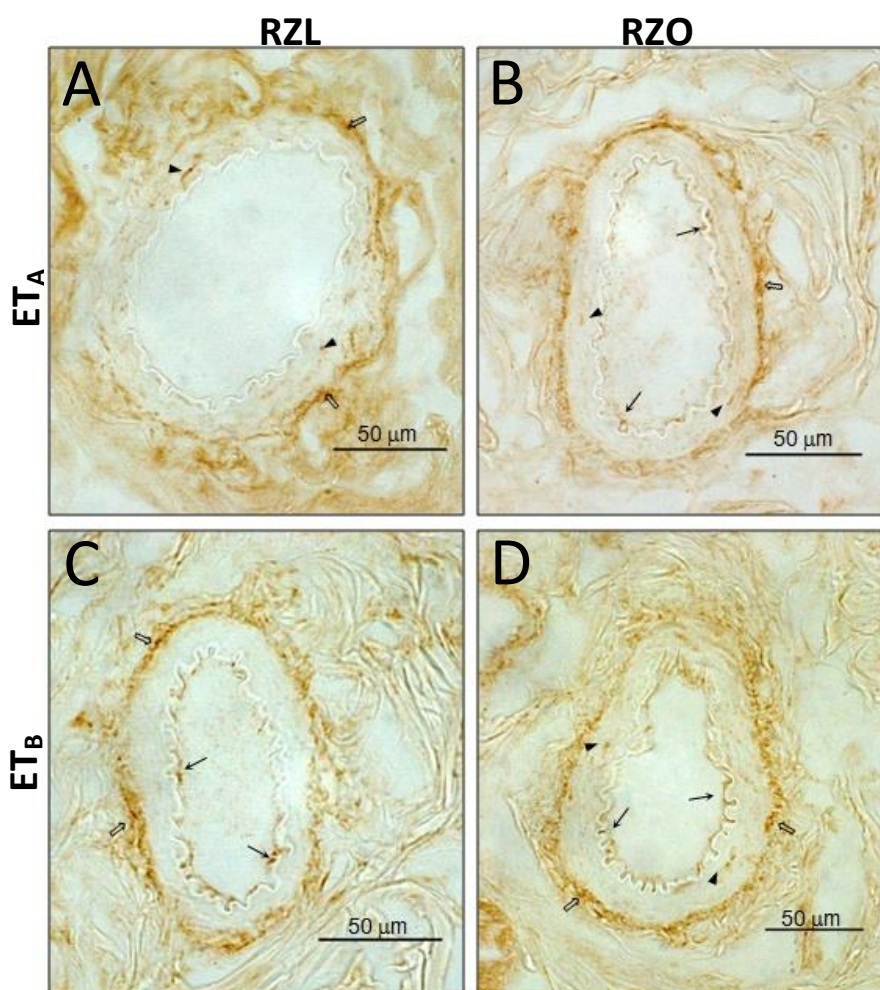


**Figura 36. Efecto del BQ-788 sobre el incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  inducida por la ET-1 en arterias penenanas de (A) RZL y de (B) RZO.** Los datos son expresados como media  $\pm$  ESM de 7-12 arterias, 1 por animal.

### 3.6.5. Localización inmunocitoquímica de los receptores de ET-1 en arterias peneanas de RZL y RZO

La inmunorreactividad para el receptor  $ET_A$  se localizó en la capa adventicia como nivel de los nervios perivasculares, de forma muy marcada como un punteado disperso a nivel de la capa muscular y eventualmente en las células endoteliales, siendo la tinción a nivel endotelial más marcada en las arterias de animales obesos (Figura 37A y B).

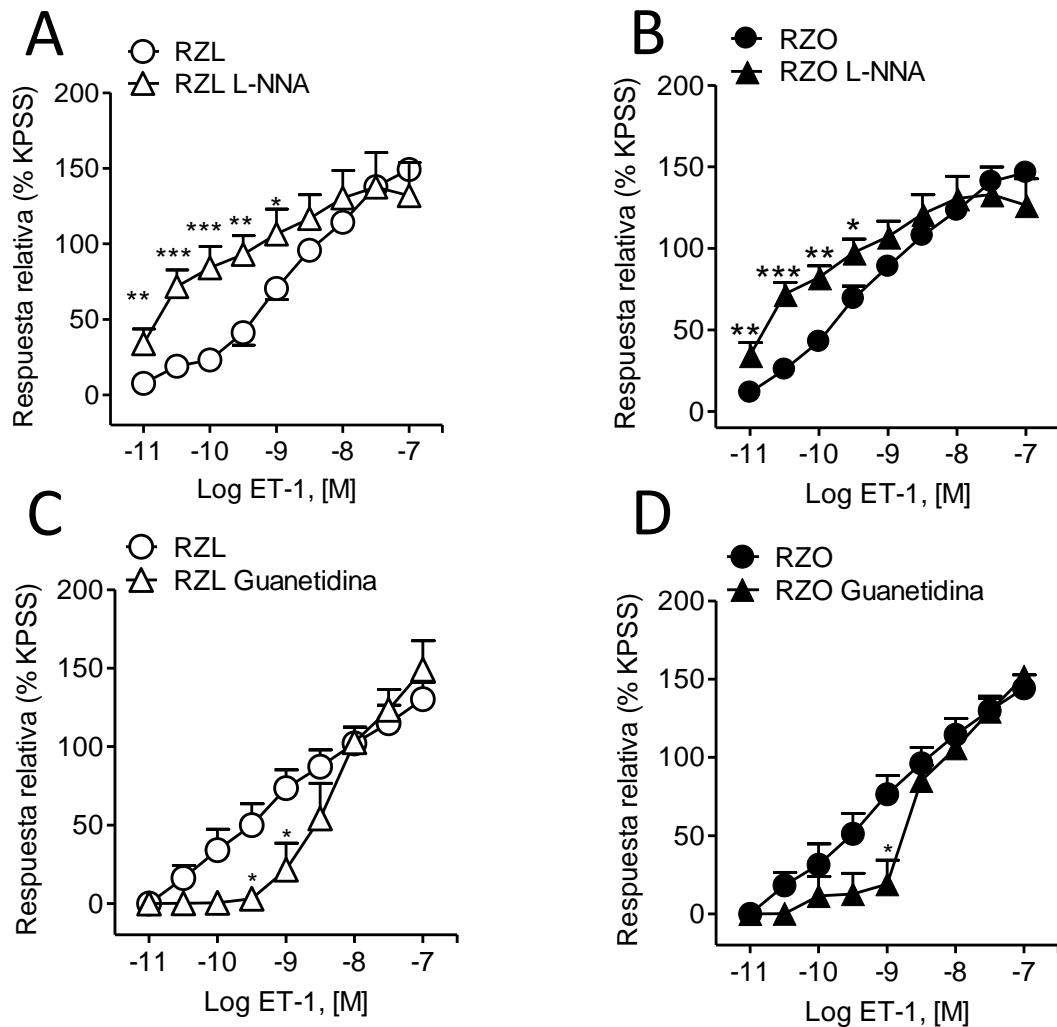
La inmunorreactividad para los receptores  $ET_B$  se localizó fundamentalmente a nivel de la capa adventicia a nivel de los nervios perivasculares (Figura 37C y D), y escasamente en el endotelio. En arterias peneanas de animales obesos también se observó inmunorreactividad en acúmulos localizados en determinados puntos de la capa muscular (Figura 37D).



**Figura 37. Localización inmunocitoquímica de los receptores de endotelina  $ET_A$  (A y B) y  $ET_B$  (C y D) en las arterias peneanas de RZL (A y C) y RZO (B y D).** Los receptores  $ET_A$  se encuentran localizados en la capa adventicia (↯), muscular (▲) y endotelial (↱) tanto en RZL como en RZO. Los receptores  $ET_B$  se localizaron en la capa adventicia (↯) y muscular (▲) en arterias de RZL, y además en el endotelio (↱) en RZO.

### 3.6.6. Papel de los nervios perivasculares en las respuestas contráctiles a la ET-1 en arterias peneanas de RZL y RZO

Con el fin de evaluar la participación del NO en la contracción a la ET-1, las arterias fueron tratadas con un inhibidor de NOS, el L-NNA (100  $\mu$ M), que potenció la respuesta vasoconstrictora a las dosis más bajas de ET-1 en arterias peneanas de RZL (Figura 38A) y RZO (Figura 38B), desplazando así la curva hacia la derecha, sin modificar la respuesta máxima. Se utilizó guanetidina, una neurotoxina adrenérgica para evaluar la posible implicación de los nervios adrenérgicos en la contracción a la ET-1. El tratamiento con guanetidina inhibió las respuestas contráctiles tanto en RZL (Figura 38C) como en RZO (Figura 38D), indicando la acción de la ET-1 sobre los nervios adrenérgicos tanto en arterias peneanas de animales sanos como obesos.



**Figura 38. Implicación de los nervios perivasculares en las respuestas contráctiles a la ET-1 en las arterias peneanas de RZL y RZO.** (A y B) Inhibición de NOS en la contracción inducida por ET-1 en (A) RZL y (B) RZO. (C y D) Efecto de la depleción adrenérgica en la contracción inducida por ET-1 en arterias de (C) RZL y (D) RZO. Los datos se expresan como media  $\pm$  ESM de 5-11 arterias, 1-2 por animal.







## V. DISCUSIÓN



La disfunción eréctil (DE) es considerada en la actualidad como un indicador temprano de enfermedad vascular subclínica debido a su alta prevalencia en pacientes con factores de riesgo cardiovascular como la hipertensión, dislipidemia, obesidad central y resistencia a la insulina, constelación de anormalidades metabólicas y vasculares conocidas en su conjunto como Síndrome Metabólico. Asimismo, la DE se contempla como un marcador potencial de enfermedad arterial coronaria silente en pacientes diabéticos tipo 2 (Gazarusso et al., 2004). La obesidad y el Síndrome Metabólico incrementan de forma marcada la incidencia tanto de DE (Fonseca y Java, 2005) como de enfermedad arterial coronaria (Alexander et al., 2003). Por otra parte, la diabetes tipo 2 y la obesidad están asociadas con resistencia a la insulina y con disfunción endotelial, factores claves en la patogénesis tanto de la isquemia miocárdica como de la DE (Fonseca y Java, 2005). Por estas razones, en el presente estudio se evaluaron de forma comparada las acciones vasculares *in vitro* de la insulina en los lechos arteriales coronario y peneano de la rata *Zucker* obesa, un modelo animal experimental de Síndrome Metabólico y resistencia a la insulina, con el fin de investigar las posibles alteraciones existentes bajo estas condiciones patológicas, así como su contribución a la patogénesis de la enfermedad arterial coronaria y de la DE, respectivamente, asociadas con la diabetes tipo 2.

A pesar de que la resistencia a la insulina se define clásicamente como el descenso de la sensibilidad a las acciones metabólicas, una amplia evidencia experimental demuestra que en pacientes diabéticos y con resistencia a la insulina, la disfunción endotelial junto con una sensibilidad disminuida a las acciones de la hormona en el endotelio vascular contribuyen a los estados de resistencia a la insulina al alterar la capacidad de la hormona de modificar el flujo sanguíneo y la distribución de sustratos (Baron et al., 1991; Kim et al., 2006). Por esta razón, en el presente estudio se han evaluado las dos vías de señalización intracelular activadas por la insulina en el endotelio vascular, la vía de la PI3K/Akt/eNOS, implicada no solo en las acciones anabólicas sino también vasodilatadoras de la hormona, y la vía de las MAPK, responsable de las acciones mitogénicas y vasoconstrictoras de la insulina, con el fin de determinar en qué medida la posible alteración de cualquiera de estas vías, o de ambas, puede contribuir a la resistencia vascular a la insulina y a la disfunción endotelial coronaria y peneana en condiciones de Síndrome Metabólico.

Los resultados obtenidos demuestran que la resistencia vascular a la insulina afecta de forma heterogénea a las arterias coronarias y peneanas de animales con Síndrome Metabólico. Así, la insulina induce vasodilatación mediada por NO y dependiente del endotelio y de la vía

PI3K/Akt/eNOS en ambos lechos arteriales de animales sanos, pero mientras que dichas relajaciones se encuentran preservadas en arterias coronarias prediabéticas (Figura 4), existe una alteración marcada de las mismas en las arterias peneanas (Figura 17). La regulación a la alta de la actividad basal Akt/eNOS junto con una reducción de la actividad MAPK probablemente debida al exceso de ácidos grasos libres saturados, parecen estar implicadas en la protección del efecto vasodilatador de la insulina en arterias coronarias, mientras que una reducción de la actividad Akt/eNOS junto con la producción de un compuesto vasoconstrictor derivado de la vía MAPK y diferente de la ET explican la reducción marcada en las relajaciones endoteliales mediadas por NO en arterias peneanas durante el Síndrome Metabólico.

Debido a que se ha descrito que el aumento de las acciones endógenas de la ET contribuye a la resistencia a la insulina en individuos obesos (Lteif et al., 2007), también se examinó el posible papel de la ET en la resistencia vascular a la insulina de las arterias peneanas. En arterias coronarias de RZO, el posible incremento de la ET endógena está compensado por una potenciación de los efectos relajantes mediados por NO de ET a través de receptores ET<sub>B</sub> de localización endotelial (Katakam et al., 2005). En nuestro estudio, a pesar de no encontrarse diferencias significativas en la acción vasoconstrictora inducida por la ET-1 en arterias peneanas bajo condiciones de resistencia a la insulina (Figura 25), la localización y distribución de sus receptores sí estuvo alterada, observándose una población de ET<sub>B</sub> contráctiles a nivel muscular en la RZO acoplados a una movilización incrementada de Ca<sup>2+</sup> intracelular.

## **1. ACCIONES DE LA INSULINA EN LAS ARTERIAS CORONARIAS BAJO CONDICIONES DE RESISTENCIA A LA INSULINA**

En pacientes con diabetes mellitus tipo 2 y Síndrome Metabólico existe un alto riesgo de complicaciones cardiovasculares, y la disfunción endotelial representa un paso clave en el desarrollo de isquemia miocárdica. Como se ha comentado previamente y con el fin de comprender mejor la relación entre resistencia a la insulina y la disfunción endotelial coronaria, se investigaron las vías de señalización de la insulina y las acciones vasodilatadoras de la hormona en las arterias coronarias de la RZO, un modelo de obesidad genética/resistencia a la insulina, encontrándose que la vasorelajación inducida por la hormona y mediada por el NO a través de la vía de PI3K/Akt/eNOS se encuentra preservada,

mientras que la vía de la MAPK está alterada en arterias coronarias de ratas obesas con resistencia a la insulina. En general, estos resultados contrastan con la alteración en los cambios hemodinámicos inducidos por la insulina descritos en el músculo esquelético (Wallis et al., 2002), así como con la resistencia selectiva a los efectos vasodilatadores dependientes del NO inducidos por la insulina a través de la vía de la PI3K/Akt/eNOS observados en arteriolas del músculo esquelético del mismo modelo animal de resistencia a la insulina/obesidad que el utilizado en el presente estudio (Eringa et al., 2007). Por otra parte, los resultados obtenidos que demuestran que las acciones vasodilatadoras de la insulina en las arterias coronarias se encuentran preservadas en RZO (Figura 4) coinciden con la escasa pérdida de sensibilidad a la insulina descrita en el miocardio de pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (Utriainen et al., 1998; Lopaschuck et al., 2010), lo que refuerza el concepto de que las arterias coronarias podrían adaptarse a los cambios hemodinámicos que se producen en condiciones de resistencia a la insulina mediante una regulación a la alta de mecanismos intracelulares en las pared arterial (Szerafin et al., 2006; Sánchez et al., 2010).

El efecto relajante *in vitro* de la insulina en arterias coronarias de animales sanos es consistente con su capacidad de incrementar el flujo sanguíneo coronario en humanos en ausencia de incrementos en la demanda de oxígeno (McNulty et al., 2000; Sundell y Knuuti, 2003). Así, el estudio inicial de McNulty y colaboradores (2000) evaluó el flujo sanguíneo miocárdico en pacientes sometidos a angiografía y el metabolismo oxidativo en respuesta a la infusión intracoronaria de insulina, observándose que la elevación fisiológica de la insulina plasmática incrementaba el flujo sanguíneo coronario en ausencia de incrementos en la demanda o consumo de O<sub>2</sub>, lo que sugiere una reducción primaria del tono coronario. Estudios posteriores utilizando técnicas no invasivas (tomografía de emisión de positrones) para la determinación del flujo sanguíneo coronario en voluntarios humanos han demostrado que la hiperinsulinemia fisiológica incrementa el flujo sanguíneo coronario, especialmente en aquellas regiones del miocardio donde la hormona estimula la captación de glucosa (Iozzo et al., 2002a). En el estudio de Sundell y colaboradores (2002b) se demuestra también que la insulina es capaz de incrementar de forma dosis-dependiente el flujo sanguíneo hiperémico miocárdico y esta respuesta estuvo correlacionada con la captación total de glucosa del cuerpo. Los resultados del presente estudio confirman el efecto vasodilatador *in vitro* de la insulina en arterias coronarias de animales sanos.

El efecto relajante de la insulina fue más pronunciado en las arterias intramiocárdicas pequeñas que en los segmentos arteriales más proximales de la circulación coronaria, dónde

se observó que la insulina inducía menor relajación o incluso ligera contracción (Figura 3), confirmando así la heterogeneidad regional de las acciones vasoactivas de la hormona previamente descrita por otros autores (Oltman et al., 2000). En las arterias coronarias del perro, la insulina pero no el IGF-I, indujo una relajación modesta en arterias coronarias de conducción y mucho más marcada en los microvasos coronarios (Oltman et al., 2000). Estos autores encuentran también diferencias en los mecanismos implicados en la relajación, evidenciando la implicación del NO y de prostanoïdes en arterias grandes y el papel de los canales de potasio dependientes de calcio ( $K_{Ca}$ ) en la vasodilatación inducida por insulina en arterias pequeñas. En el presente estudio se utilizaron los segmentos distales de segundo y tercer orden de la arteria coronaria descendente izquierda con el fin de caracterizar el efecto relajante de la insulina tanto en RZL como en RZO. Además, en los estudios *in vivo* realizados en humanos y anteriormente discutidos, la hormona induce un aumento del flujo sanguíneo miocárdico, por lo que en la se ha evaluado el posible beneficio del tratamiento con insulina en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 y con enfermedad arterial coronaria, ya que la mortalidad se ve significativamente reducida con una terapia intensiva de insulina tras sufrir un infarto de miocardio (Lautamäki et al., 2006).

La capacidad vasodilatadora y los incrementos del flujo sanguíneo inducidos por la insulina en el músculo esquelético están alterados en estados metabólicos anormales que cursan con resistencia a la insulina como la obesidad y la diabetes (Laakso et al., 1990, 1992). De forma interesante, la relajación dependiente del endotelio inducida por la insulina no estuvo alterada en arterias coronarias de ratas obesas resistentes a la insulina a diferencia de lo que sucede en las arterias del músculo esquelético (Eringa et al., 2007) y en otras arterias periféricas como la aorta (Yang et al., 2007) y como se demuestra también en nuestro estudio en las arterias peneanas (Contreras et al., 2010) en el mismo modelo animal de resistencia a la insulina. Nuestras observaciones coinciden, sin embargo, con los efectos benéficos de la insulina sobre el miocardio en estados de isquemia y su capacidad para mejorar la función endotelial y el flujo sanguíneo miocárdico en la diabetes mellitus tipo 2 y tipo 1 (Sundell et al., 2002a, 2002b; Lautamäki et al., 2006). Así, en estudios *in vivo* realizados en pacientes con diabetes tipo 2 se ha demostrado que si bien la captación de glucosa por el miocardio inducida por insulina fue menor que en voluntarios sanos, el incremento de flujo sanguíneo inducido por la hormona estuvo preservado en los pacientes diabéticos (Iozzo et al., 2002b; Lautamäki et al., 2006). También en pacientes con diabetes tipo 1, los efectos vasodilatadores de la insulina fueron similares a los de pacientes no diabéticos (Sundell et al., 2002a).

### 1.1. Implicación de la vía de la PI3K/Akt/eNOS en las acciones vasculares de la insulina en las arterias coronarias bajo condiciones de Síndrome Metabólico

Investigaciones previas han caracterizado las vías de señalización intracelular de la insulina a nivel de las arterias del músculo esquelético, tejido donde se localiza el 80-90% de la captación de glucosa estimulada por insulina, y que por ello constituye una de las primeras dianas de las acciones vasculares de esta hormona *in vivo*. Eringa y colaboradores (2002, 2007) han estudiado ampliamente las acciones de la hormona en el lecho vascular del músculo cremáster de la rata, comprobando que la insulina no induce cambios significativos en el diámetro de estas arterias. Sin embargo, utilizando el inhibidor específico de la NOS (N-nitro-L-arginina) desenmascararon un efecto vasoconstrictor de la hormona confirmando así la producción de ET-1 dependiente de insulina a dosis fisiológicas de la hormona. Mediante el uso de un antagonista no selectivo del receptor de ET-1 (PD-142893), observaron la liberación de NO a dosis farmacológicas de insulina y su efecto relajante. El tratamiento con un inhibidor de la enzima PI3K también desenmascara la producción de ET-1 al inducir una vasoconstricción dependiente de insulina, lo que muestra la implicación de esta vía en la producción de un compuesto vasodilatador. Este hecho es importante debido a que una de las características descritas para los estados de resistencia a la insulina, como se discutirá más adelante, consiste en el deterioro de la vía de señalización intracelular dependiente de la PI3K con la consiguiente magnificación de la vía vasoconstrictora de la MAPK mediada por ET (Jiang et al. 1999; Eringa et al., 2007). Como se demuestra en el presente estudio y en estudios *in vivo* previos (Oltman et al., 2000; Sundell et al., 2002b; Lautamäki et al., 2006), se observan diferencias importantes en la reactividad del lecho arterial coronario en el que la insulina induce una respuesta relajante neta (Figura 4).

La alteración de la vasodilatación mediada por la insulina y la resistencia vascular a la insulina periférica se ha asociado con el deterioro de la vía PI3K/Akt en modelos de roedores con resistencia a la insulina (Jiang et al. 1999; Eringa et al., 2007; Contreras et al., 2010), y también en arterias de pacientes diabéticos tipo 2 (Okon et al., 2005). En el presente estudio la vasodilatación inducida por la insulina en las arterias coronarias de RZL y de RZO fue abolida por la retirada mecánica del endotelio vascular, indicando la dependencia del endotelio del efecto vasodilatador de la insulina (Figura 5A y B). Otra evidencia de la implicación endotelial en la respuesta a la insulina de los vasos coronarios fue la correlación existente entre la máxima relajación máxima producida por la insulina y la relajación inducida por ACh, agente



cuyo efecto vasodilatador depende de la integridad de las células endoteliales (Figura 5C y D). Estos resultados estarían de acuerdo con los publicados por Otlman y colaboradores (2000) en las arterias coronarias del perro, donde la retirada mecánica del endotelio mediante fricción de la luz vascular con un hilo de sutura, también suprimía el efecto relajante de la insulina.

Por otra parte, la vasodilatación inducida por la insulina en las arterias coronarias de RZL y de RZO fue abolida también por la inhibición tanto de la enzima NOS (Figura 10A y B) como de la PI3K (Figura 6A y B). Estos hallazgos indican que el efecto relajante neto de la insulina es dependiente de la activación de la vía de PI3K/Akt/eNOS y de la producción de NO nivel del endotelio, tanto en las arterias coronarias de ratas sanas como de ratas obesas prediabéticas. En arterias de humanos y en modelos de roedores con resistencia a la insulina, el defecto en la vía de señalización intracelular de la insulina y el deterioro de la vasodilatación inducida por la hormona han sido adscritos tanto a alteraciones en la fosforilación de Akt (Jiang et al., 1999; Okon et al., 2005; Kim et al., 2008) y/o de la eNOS (Okon et al., 2005; Kim et al., 2008; Symons et al., 2009) estimuladas por la insulina, como a la disminución de la expresión de la eNOS (Okon et al., 2005; Eringa et al., 2007), o incluso al incremento de la producción de especies reactivas de oxígeno y la consecuente inactivación de NO (Katakam et al., 2005).

En el presente estudio, se ha observado que la fosforilación que induce la insulina de Akt en la Ser<sup>473</sup>, necesaria para la actividad completa de la Akt, permanece inalterada en las arterias coronarias de ratas obesas con resistencia a la insulina (Figura 6C y D). Estos datos son contrarios a los descritos en los microvasos del tejido adiposo de RZO, donde la activación de Akt se encuentra alterada por la acción de citoquinas derivadas del tejido adiposo como es el TNF- $\alpha$  (Jiang et al., 1999). Sin embargo, nuestros resultados estarían en concordancia con lo descrito en otros tejidos vasculares, donde la fosforilación de Akt mediada por insulina se encuentra preservada tanto en modelos de obesidad/resistencia a insulina genéticos (Eringa et al., 2007) como inducidos por una dieta rica en grasas (Molnar et al., 2005; Symons et al., 2009). Curiosamente, en el presente estudio observamos que la fosforilación basal de Akt y la expresión de esta enzima estuvieron reguladas a la alta en arterias coronarias de las ratas obesas (Figura 7), lo que sugiere la existencia de mecanismos compensadores que probablemente contrarrestan la alteración de la vía de señalización a otro nivel inferior. Además, nuestros hallazgos muestran que la insulina aumenta la expresión de Akt en arterias coronarias de animales sanos (Figura 8A), lo que podría explicar la mayor expresión basal de Akt en arterias coronarias de RZO, expuestas crónicamente a condiciones de hiperinsulinemia

*in vivo*, y donde la insulina exógena no incrementó más aún el contenido de Akt, ya incrementado *per sé* (Figura 8B). De acuerdo con estas observaciones, se ha descrito que en el curso de otras alteraciones metabólicas, como es la hiperleptinemia en un modelo de hiperleptinemia endógena en ratas con obesidad inducida por una dieta rica en grasas, la vía de la Akt está incrementada en el tejido cardíaco con el fin de reconducir el metabolismo de los ácidos grasos (Guzmán-Ruiz et al., 2010).

A concentraciones fisiológicas, la insulina estimula tanto la actividad como la expresión de la enzima eNOS en las células endoteliales (Kuboki et al., 2000; Kim et al., 2006). Se ha descrito que la fosforilación de la eNOS en la Ser<sup>1176</sup> está alterada en condiciones de hiperglucemia (Federici et al., 2001) y también por las concentraciones elevadas de ácidos grasos libres saturados bajo condiciones de resistencia vascular a la insulina (Du et al., 2006; Symons et al., 2009). Nuestros resultados demuestran que ni la expresión basal de eNOS ni su fosforilación en la Ser<sup>1177</sup> estimulada por insulina se encuentran alteradas en las arterias coronarias de RZO (Figura 10C y D y Figura 11). Además, el tratamiento agudo con concentraciones suprafisiológicas de ácido palmítico, un ácido graso saturado, no afectó ni la fosforilación de eNOS inducida por la insulina, ni a las relajaciones dependientes del endotelio estimuladas por insulina y por ACh (Figura 15). Estos datos inicialmente difieren de los descritos recientemente en arterias de ratones con obesidad inducida por una dieta rica en grasas, en los que se encontró que los ácidos grasos libres son responsables de la alteración de la fosforilación tanto basal como inducida por la insulina de la eNOS, anomalías que estuvieron asociadas con disfunción endotelial e hipertensión en estos animales (Symons et al., 2009). Sin embargo, la preservación de la fosforilación de la eNOS inducida por la insulina observada en las arterias coronarias de RZO en el presente estudio, estaría de acuerdo con otros estudios realizados en arterias de un modelo de obesidad y diabetes inducida por la dieta en ratón, donde en lugar de estar alterada la fosforilación de eNOS mediada por la insulina, estuvo afectada la dimerización de eNOS debido al estrés oxidativo y al incremento de los niveles de peroxinitrito, contribuyendo así al descenso en la actividad de la eNOS y la producción de NO y a la disfunción endotelial (Molnar et al., 2005).

En este estudio también se observó que la fosforilación de la eNOS no solamente no está disminuida sino que está regulada a la alta en arterias coronarias de animales obesos (Figura 11A), lo que estaría de acuerdo con los resultados del estudio de Fulton y colaboradores (2004), en el que se demuestra el incremento de los niveles basales de fosforilación de eNOS en la Ser<sup>1176</sup> en el miocardio del mismo modelo animal de obesidad/

Síndrome Metabólico. Estos datos junto con las observaciones del presente estudio sugieren que el corazón se encuentra protegido por un aumento en la actividad de eNOS en estados de resistencia a la insulina. La regulación a la alta de la vía Akt/eNOS podría representar así mismo un mecanismo compensador para mantener los niveles normales de NO en la pared arterial, en caso de que su biodisponibilidad se encuentre comprometida, como se ha sugerido en arterias de ratones con obesidad y diabetes inducidas por la dieta (Molnar et al., 2005). En la misma dirección, se observó que los niveles plasmáticos de  $\text{NO}_2^-$  estuvieron significativamente reducidos en RZO comparados con sus controles RZL, lo que sugiere que la generación/biodisponibilidad de NO endógeno se encuentra alterada en estos animales (Fulton et al., 2004). Por otra parte, y en concordancia con estos hallazgos, se ha demostrado también que la producción de ROS y el estrés oxidativo están incrementados en arterias coronarias de RZO (Debin et al., 2008; Katakam et al., 2005), y a nivel del miocardio, se ha descrito un incremento de la actividad de los sistemas de defensa antioxidante junto con niveles no alterados de malondialdehído, el producto principal de la peroxidación lipídica, bajo condiciones de Síndrome Metabólico (Conti et al., 2004). De esta forma, la regulación a la alta de la actividad de eNOS a través de la regulación post-transcripcional mediante el incremento de su fosforilación contrarrestaría la menor biodisponibilidad de NO debido al incremento del estrés oxidativo. Por otra parte, esta regulación a la alta de la vía Akt/eNOS endotelial probablemente asociada a la mayor producción de NO y consecuente vasodilatación, podría explicar los efectos beneficiosos de la terapia con insulina en pacientes diabéticos con isquemia miocárdica (Sundell et al., 2002a, 2002b; Lautamäki et al., 2006).

En el presente estudio se ha observado también que el incremento de la actividad de la vía de la Akt/eNOS parece contribuir a la preservación de las relajaciones  $\beta$ -adrenérgicas en las arterias coronarias de animales obesos con resistencia a la insulina (Figura 9). Se ha descrito que la vasodilatación  $\beta$ -adrenérgica se encuentra disminuida en las arterias coronarias de modelos experimentales de diabetes tipo 2 y de Síndrome Metabólico como son la rata Zucker diabética (RZD) y la rata Wistar Ottawa Karlsburg W (WOKW), respectivamente (Grisk et al., 2007). En nuestro estudio, el agonista no selectivo de los  $\beta$ -adrenoceptores isoproterenol indujo una vasodilatación de similar magnitud en RZL y RZO (Figura 9C) lo que sugiere que las relajaciones  $\beta$ -adrenérgicas están preservadas en las arterias coronarias de animales obesos con resistencia a la insulina. Por otra parte, mientras que las relajaciones inducidas por el isoproterenol no fueron modificadas por el bloqueo de la PI3K en arterias de animales sanos, la inhibición de esta enzima sí redujo las relajaciones en arterias coronarias de RZO (Figura 9A

y B), lo que sugiere que la vía de la PI3K/Akt está implicada en la vasodilatación  $\beta$ -adrenérgica coronaria bajo condiciones de resistencia a la insulina, pero no en condiciones fisiológicas, probablemente como consecuencia de la regulación a la alta de la misma demostrada y discutida anteriormente.

Los receptores  $\beta$ -adrenérgicos juegan un papel esencial como reguladores de la homeostasis cardiovascular, y además de su función en el corazón, donde activan y favorecen el incremento del gasto cardiaco, también se localizan en la pared vascular. Todos los subtipos de  $\beta$ -adrenoceptores, fundamentalmente los  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_3$  están implicados en la vasodilatación, con diferencias en las vías de señalización implicadas dependiendo de su localización en las células del músculo liso o del endotelio vascular. Los receptores del subtipo  $\beta_2$ -adrenérgico son los predominantes en el músculo liso y median la vasorelajación a través de la activación de la vía de la adenilatociclasa y el AMPc. Sin embargo, en la circulación sistémica, y dependiendo del lecho vascular, la relajaciones mediadas por  $\beta$ -adrenoceptores pueden ser completa o parcialmente dependientes del endotelio y mediadas por la liberación de NO derivado de la vía de señalización de la PI3K/eNOS (Ferro et al., 2004). En el presente estudio, el efecto inhibitor del bloqueante de la PI3K en las relajaciones del isoproterenol de arterias coronarias de RZO y no de animales sanos indica que esta vía de señalización regulada a la alta puede cobrar una especial relevancia en la circulación coronaria en condiciones de resistencia a la insulina. En el estudio llevado a cabo por D'Angelo y colaboradores (2006) en el mismo modelo de Síndrome Metabólico, estos autores demostraron, sin embargo, que tanto el incremento del gasto cardiaco como las respuestas vasodilatadoras inducidas por el isoproterenol se encuentran reducidas en la RZO con respecto a RZL, lo que sugiere que la señalización  $\beta$ -adrenérgica está comprometida tanto en los miocitos cardiacos como vasculares en condiciones de resistencia a la insulina, lo que determina una capacidad alterada de regular la presión sanguínea en situaciones de estrés. Los mismos autores encontraron que la relajación inducida por agonistas  $\beta$ -adrenérgicos estaba disminuida en la circulación mesentérica pero no en arterias femorales de RZO. Estas diferencias podrían reflejar la diferente distribución de los subtipos de receptores  $\beta$  adrenérgicos en los distintos lechos vasculares, y su localización en el endotelio y/o el músculo liso vascular. Del mismo modo, la regulación a la alta de la vía de la PI3K/Akt/eNOS en las arterias coronarias de ratas obesas podría explicar una mayor participación de receptores endoteliales compensando así las respuestas vasodilatadoras  $\beta$ -adrenérgicas alteradas. Sin embargo, la distribución de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos en la

microcirculación periférica y los efectos de la obesidad sobre su expresión y/ actividad, permanecen aún sin clarificar.

### **1.2. Implicación de la vía de las MAPK en la vasodilatación inducida por la insulina en las arterias coronarias bajo condiciones de Síndrome Metabólico**

La mayoría de los estudios sobre la resistencia vascular a la insulina demuestran un desequilibrio en la actividad de las vías de señalización de la insulina en el endotelio vascular, donde la activación de la vía de la PI3K/Akt/eNOS se encuentra alterada, mientras que la vía de las MAPK, responsable de las acciones mitogénicas de la hormona y de la producción del vasoconstrictor ET-1, está intacta o sobre-estimada (Jiang et al., 1999; Potenza et al., 2005; Eringa et al., 1997; Lteif et al., 2007; Symons et al., 2009). En contraste con lo que se ha descrito en estudios en otros lechos vasculares, en el presente trabajo encontramos que la vía de la MAPK estaba alterada en arterias coronarias de ratas obesas con resistencia a la insulina, y que los niveles de fosforilación de ERK1/2 tanto basales como estimulados por insulina, estuvieron reducidos en RZO. Esta menor actividad de la ERK MAPK no estuvo relacionada, sin embargo, con alteraciones en su expresión, y el contenido basal de proteína fue el mismo en arterias de RZL y de RZO (Figuras 12 y 13).

En arterias del músculo esquelético, la insulina estimula la producción de NO y ET-1, dos agentes con acciones vasoactivas opuestas cuyos efectos, o bien se compensan, o bien el efecto neto de la insulina a nivel vascular es una ligera vasodilatación con incremento del flujo sanguíneo (Cardillo et al., 1999; Eringa et al., 2007). En estados de resistencia a la insulina, las alteraciones en la producción de NO por la vía de la Akt/eNOS, facilitan el incremento de la actividad de la vía de la MAPK y la producción de ET-1, limitando así el flujo sanguíneo y la captación de glucosa por los tejidos (Eringa et al., 2007; Lteif et al., 2007). En el presente estudio, la activación de la fosforilación de ERK1/2 inducida por insulina no estuvo asociada con efectos vasoconstrictores significativos en arterias coronarias de ratas sanas, como demuestra la ausencia de potenciación de la relajación inducida por la insulina tras la inhibición selectiva de la MAPK/ERK con el PD-98059 (Figura 12 A y B) o de los receptores de ET con el bosentán (Figura 14). Además, y a diferencia de lo observado en las arteriolas del músculo esquelético de RZO (Eringa et al., 2007), en condiciones de bloqueo de la NOS, tampoco se desenmascaró ningún efecto vasoconstrictor de la hormona (Figura 10A y B). En las arterias coronarias, por tanto, la activación de la MAPK por la insulina podría estar asociada

con otras acciones mitogénicas de la insulina en las células endoteliales, como es la inducción de la expresión de moléculas de adhesión a través de la prenilación de las proteínas Ras y Rho (Montagnani et al., 2002a). El defecto de actividad de la MAPK que se demuestra en las arterias coronarias de RZO en el presente estudio, probablemente esté relacionado con la atenuación de las acciones mitogénicas mediadas por insulina. Otra posible explicación a la ausencia de efectos potenciadores de los bloqueantes de la MAPK o de los receptores de ET sobre las relajaciones inducidas por insulina en las arterias coronarias, es que los efectos vasoconstrictores de la hormona dependan de la liberación de otros factores vasoconstrictores diferentes a la ET-1. De hecho, en arterias coronarias de RZL y de RZO, se ha demostrado que la insulina incrementa la producción de ROS, lo que se asocia con efectos vasoconstrictores, ya que tanto los inhibidores de la NADPH oxidasa como los secuestradores de ROS, mejoraron la vasodilatación inducida por la hormona tanto en arterias control como en arterias de ratas obesas/resistentes a la insulina (Katakam et al., 2005).

De forma interesante, en el presente estudio se ha observado que el tratamiento agudo con ácido palmítico a concentraciones suprafisiológicas inhibió de forma significativa la fosforilación de la ERK1/2 estimulada por la insulina en arterias coronarias de animales sanos, hasta alcanzar los niveles disminuidos de las arterias de RZO (Figura 12C y D), lo que sugiere que las concentraciones elevadas de ácidos grasos saturados podrían ser responsables del defecto de la activación de la vía dependiente de la ERK/MAPK en las arterias coronarias de ratas con resistencia a la insulina. Actualmente está bien establecido que los ácidos grasos libres contribuyen a la patogénesis de la resistencia a la insulina en el músculo esquelético, ya que interfieren con la cascada de señalización de la PI3K/Akt/eNOS, por lo que alteran tanto la captación de glucosa estimulada por la insulina como el incremento del flujo sanguíneo derivado de la producción de NO (Dresner et al., 1999; Steinberg et al., 2000b; Belfort et al., 2005; Bakker et al., 2008; Symons et al., 2009). Los hallazgos del presente estudio demuestran la acción inhibidora de los ácidos grasos libres sobre la fosforilación de la ERK/MAPK, tanto basal como estimulada por la insulina, sin embargo no parecen afectar a la fosforilación de la Akt o de la eNOS estimuladas por insulina en arterias coronarias (Figura 6 y 10). Estos datos difieren de la falta de efecto de concentraciones suprafisiológicas de palmitato sobre la actividad de la ERK1/2, observada en las células endoteliales de aorta (Symons et al., 2009) o incluso el efecto de estimulación de las mismas mediado por la PKC $\theta$  en las arterias de resistencia del músculo gracilis (Bakker et al., 2008). La alteración selectiva de la vía de la MAPK, pero no de la vía de la PI3K por parte de los ácidos grasos libres en las arterias

coronarias, es diferente de lo descrito en otros lechos vasculares, lo que podría estar relacionado con el papel especial que juegan los ácidos grasos en la oxidación y el metabolismo energético del corazón. Así, en un modelo animal de obesidad inducida por la dieta, los altos niveles de leptina redujeron la sensibilidad de los sistemas enzimáticos responsables de la captación y oxidación de ácidos grasos a través de la potenciación de la vía de Akt (Guzmán-Ruiz et al., 2010).

En resumen, de los resultados obtenidos en las arterias coronarias se puede deducir que la vasodilatación mediada por insulina se encuentra preservada en las arterias coronarias bajo condiciones de resistencia a la insulina debido, en parte, a la regulación a la alta de la vía de señalización de la insulina que produce la activación de eNOS a través de su fosforilación por la Akt, favoreciendo así la producción de NO endotelial. Estos hallazgos son consistentes con el efecto beneficioso de la terapia con insulina en pacientes diabéticos. Por otra parte, hemos demostrado que la resistencia a la insulina altera la vía de ERK MAPK en las arterias coronarias, probablemente como consecuencia del efecto de los niveles elevados de ácidos grasos libres saturados, lo cual no contribuye a un incremento de la vasodilatación coronaria inducida por la insulina, pero sí probablemente a un descenso de las acciones mitogénicas y proaterogénicas de la hormona en las células endoteliales.

## **2. ACCIONES DE LA INSULINA EN LAS ARTERIAS PENEANAS BAJO CONDICIONES DE RESISTENCIA A LA INSULINA**

Como se ha descrito en el apartado I de Revisión Bibliográfica, las anormalidades metabólicas y cardiovasculares que acompañan al Síndrome Metabólico, es decir, la intolerancia a la glucosa, la dislipidemia, la resistencia a la insulina y la hipertensión actúan como factores de riesgo independientes para la DE y todos ellos están asociados en cierta medida con disfunción endotelial (Fonseca & Jawa, 2005), si bien los mecanismos de esta disfunción en las arterias peneanas no están claros. Estudios novedosos en un modelo animal de DE asociada a la diabetes tipo 1, han demostrado una alteración en la vía de la PI3K/Akt/eNOS en el tejido eréctil asociada a una capacidad eréctil disminuida en estos animales (Musicki et al., 2005). Sin embargo, no se conocen los efectos de la insulina en la vasculatura peneana ni de individuos sanos ni de modelos de DE asociados a diabetes tipo 2 y estados de resistencia a la insulina. Nuestro grupo ha demostrado recientemente que existen alteraciones marcadas en la estructura vascular y disfunción endotelial medida por la disminución de las respuestas relajantes a la ACh en las arterias peneanas de RZO (Villalba et al., 2009), modelo de ED asociada al Síndrome Metabólico (Wingard et al., 2007). En este estudio se evaluó si los efectos vasculares de la insulina están alterados en las arterias peneanas bajo condiciones de resistencia a la insulina en la RZO.

### **2.1. Implicación de la vía de la PI3K/Akt/eNOS en la relajación inducida por la insulina en arterias peneanas bajo condiciones de Síndrome Metabólico**

Los resultados obtenidos en las arterias peneanas demuestran que la insulina induce una vasodilatación dependiente del endotelio mediada por la liberación de NO a través de la vía de PI3K/Akt/eNOS. Esta vía se encuentra alterada en arterias de RZO, lo que desenmascara efectos vasoconstrictores de la hormona dependientes de la vía de las MAPK. La disfunción endotelial peneana en animales con resistencia a la insulina se pone de manifiesto por la disminución de la relajación estimulada por la insulina y mediada por NO en los segmentos arteriales penenanos (Figura 16 y 17), lo cual está correlacionado, a su vez, con una estructura anormal de las arterias y la presencia de remodelado vascular (Villalba et al., 2009), lo que probablemente contribuye a la disminución de la capacidad eréctil descrita previamente en



este modelo animal (Wingard et al., 2007), y a la DE asociada con estados de resistencia a la insulina como diabetes, obesidad e hipertensión (Fonseca y Jawa, 2005).

Si bien la alteración del efecto relajante de la insulina en arterias penenanas de RZO contrasta con la vasodilatación preservada observada en arterias coronarias de los mismos animales como se demuestra también en nuestro estudio, estos resultados coinciden con los descritos en otras arterias periféricas de la RZO como la aorta (Contreras et al., 2010) y las arteriolas del músculo esquelético (Eringa et al., 2007), y estarían de acuerdo con la alteración de la vasodilatación mediada por la insulina descrita previamente en sujetos obesos (Baron et al., 1991; Steinberg et al., 1996). Los experimentos de este trabajo demuestran que la relajación inducida por la insulina en las arterias penenanas es dependiente del endotelio y mediada por NO en animales sanos, como se deduce del efecto inhibitorio de la retirada mecánica del endotelio, así como de los bloqueantes de la NOS, además de la correlación positiva existente entre la vasodilatación inducidas por la insulina y por el agonista endotelial ACh (Figura 19 y 22). Además, estos datos proporcionan la evidencia farmacológica de que la vía de la PI3K/Akt se encuentra involucrada en los efectos vasoactivos de la insulina en las arterias penenanas (Figura 20A y B). Esta vía juega un papel clave en la fisiología de la erección, como responsable de la producción sostenida de NO que mantiene la erección mediante la estimulación de eNOS por el *shear stress*, tras el incremento del flujo sanguíneo de los cuerpos cavernosos provocados por la liberación inicial de NO de los nervios por el estímulo sexual (Hurt et al., 2002; Prieto, 2008).

La significación funcional de los efectos vasculares de la insulina mediados por el NO derivado de la vía de PI3K/Akt/eNOS ha sido descrita en estudios que muestran la protección vascular que ejerce la hormona en la circulación coronaria. Así, la administración *in vivo* de insulina mejora la vasodilatación dependiente del endotelio y disminuye la muerte apoptótica después de la isquemia miocárdica (Gao et al., 2002a; Ma et al., 2006). Además, los resultados observados en las arterias coronarias de los mismos animales, realizados paralelamente, demostraron que los efectos vasodilatadores de la insulina dependientes de la vía PI3K/Akt/eNOS, no están alterados bajo condiciones de resistencia a la insulina (Contreras et al., 2011), como se ha descrito en la primera parte de esta discusión, lo que demuestra la protección de los efectos relajantes de la insulina en el lecho coronario, a diferencia de los que ocurre en las arterias penenanas.

Estudios previos han demostrado también alteraciones de la vía de la Akt/eNOS en la disfunción endotelial asociada a la edad y a la diabetes tipo 1. Así, en animales de edad avanzada con resistencia a la insulina, la vasorelajación arterial inducida por la hormona y la fosforilación de la eNOS están disminuidas (Li et al., 2009b). Asimismo, se han descrito previamente alteraciones en la actividad de la vía de la PI3K/Akt y en la fosforilación de la eNOS en modelos de diabetes tipo 1 asociados a DE, como consecuencia de la O-glucosilación y consecuente inactivación de la eNOS debido a la hiperglucemia (Federici et al., 2002; Musicki et al., 2005).

En el presente estudio se observó la disminución de efecto vasodilatador inducido, no sólo por la insulina, sino también por el agonista de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos isoproterenol, como demuestra el efecto reducido del inhibidor selectivo de la PI3K sobre dichas relajaciones en arterias peneanas de RZO, lo que confirma que la vía de PI3K/Akt está alterada en el tejido peneano de este modelo animal de resistencia a la insulina y Síndrome Metabólico (Figura 21). Contrariamente a lo descrito en modelos animales de diabetes mellitus tipo 1, no es probable que la alteración observada en la vía de la PI3K/Akt sea debida a la hiperglucemia, ya que este modelo animal de resistencia a la insulina, la rata *Zucker* obesa, mostró hiperinsulinemia pero sólo una leve hiperglucemia (Tabla 1). Por otra parte, el deterioro de la vasodilatación mediada por NO y estimulada por insulina en las arteriolas del músculo esquelético de RZO se ha asociado con la disminución de la expresión de la eNOS (Eringa et al., 2007). Sin embargo, en las arterias peneanas de la RZO nuestro grupo ha demostrado recientemente que el contenido de proteína eNOS no se encuentra alterado (Villalba et al., 2009). Los datos funcionales de los experimentos del presente estudio confirman los hallazgos de estudios bioquímicos previos en los que se demuestra que la actividad de la PI3K inducida por insulina y la fosforilación de eNOS en la Ser<sup>1177</sup> estuvieron significativamente reducidas en microvasos de RZO (Jiang et al., 1999). Además, la menor vasodilatación estimulada por insulina junto con la menor fosforilación y expresión de Akt también han sido observadas en arterias de pacientes (Okon et al., 2005) y en modelos de roedores (Kobayashi et al., 2004) con diabetes mellitus tipo 2. Los resultados obtenidos sugieren que la disfunción endotelial peneana y la alteración de la vasodilatación mediada por NO son debidas, en parte, a la alteración de la vía PI3K/eNOS en arterias peneanas de RZO resistentes a la insulina. Estas observaciones estarían de acuerdo con datos de un estudio reciente en el cual se determinó la contribución de la vía de la insulina que activa a la eNOS a la regulación de la función endotelial y la presión sanguínea, observándose que los elevados

niveles de ácidos grasos produjeron alteraciones en la vía de la Akt a nivel de la fosforilación de eNOS, así como disfunción endotelial e hipertensión en ratones con obesidad inducida por la dieta (Symons et al., 2009).

A pesar de la alteración de la vía de la Akt/eNOS en arterias peneanas de RZO, y como se demuestra también en este estudio, en las arterias coronarias de los mismos animales tanto la actividad de eNOS como la actividad y la expresión de la Akt estuvieron incrementadas (Figura 7), por lo que en el lecho coronario, lejos de estar alterada la vía de PI3K/Akt/eNOS, estuvo regulada a la alta preservándose así las relajaciones de la insulina, y tampoco fue afectada por concentraciones suprafisiológicas de ácido palmítico, como se ha descrito anteriormente (Contreras et al., 2011). Las RZO hiperinsulinémicas de 17-18 semanas de edad utilizadas durante el presente estudio padecen DE (Wingard et al., 2007) y mostraron disfunción endotelial y resistencia vascular a la insulina, junto con una estructura vascular anormal previamente al desarrollo de hipertensión (Villalba et al., 2009). Estos hallazgos refuerzan el concepto clínico de que la DE es una señal temprana de la enfermedad vascular subclínica (Montorsi et al., 2003b).

De forma interesante, la disfunción endotelial que implica a la vía de la PI3K/eNOS/NO observada en este estudio afecta también al efecto vasodilatador inducido por los agonistas  $\beta$ -adrenérgico, como se deduce de la menor relajación que induce el isoproterenol en las arterias peneanas de RZO (Figura 21). Esta alteración, podría ser adscrita en principio al fallo de la vía de señalización del AMPc/proteína cinasa A, vía principal acoplada a la relajación  $\beta$ -adrenérgica a nivel del músculo liso vascular. Sin embargo, las relajaciones inducidas por el activador de la adenilatociclasa, forskolina, no estuvieron alteradas, mientras que la inhibición de la enzima PI3K no redujo las relajaciones al isoproterenol en arterias peneanas de animales obesos comparadas con arterias control (Figura 21), demostrando que la alteración de la relajación  $\beta$ -adrenérgica se localiza a nivel de la vía endotelial de la PI3K/eNOS. Estos datos estarían de acuerdo con estudios recientes, discutidos previamente, que demuestran la disminución del gasto cardiaco y respuestas vasopresoras deprimidas al isoproterenol en RZO debido a la alteración en la señalización de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos tanto en los miocitos vasculares como cardiacos de RZO (D'Angelo et al., 2006). De esta forma, el defecto de la vasodilatación mediada por los  $\beta$ -adrenoceptores provoca una incapacidad para regular la presión sanguínea tras situaciones de estrés en RZO prediabéticas. Los receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos son el subtipo de receptores predominantes en la mayoría de músculos lisos vasculares, y median relajaciones que dependen, completa o parcialmente, de la liberación de

NO del endotelio vascular derivado de la vía de PI3K (Ferro et al., 2004). Respecto al tejido eréctil, los  $\beta_2$ -adrenoreceptores están involucrados en la relajación de las arterias peneanas (Simonsen et al., 1997a), y se ha propuesto que la vasodilatación  $\beta$ -adrenérgica juega un papel en la respuesta eréctil durante la liberación de adrenalina asociada a la actividad sexual (Simonsen et al., 1997a; Prieto et al., 2008). Por lo tanto, esta alteración de la respuesta a los agonista  $\beta$ -adrenérgicos, observada por primera vez en arterias peneanas de RZO, podría también contribuir a la disfunción endotelial y a la DE asociadas con estados de resistencia a la insulina, a diferencia del lecho coronario, donde la relajación  $\beta$ -adrenérgica no se ve afectada, y sólo depende de la vía PI3K/Akt bajo condiciones de Síndrome Metabólico, en las que esta vía, a diferencia de las arterias peneanas, está regulada a la alta.

## **2.2. Implicación de la vía de las MAPK en la vasodilatación inducida por la insulina en arterias peneanas bajo condiciones de Síndrome Metabólico**

La vía de señalización de la insulina dependiente de las MAPK promueve acciones pro-hipertensivas y pro-aterogénicas, mediadas en parte a través de la producción de ET-1, y normalmente compensadas por la vía de la PI3K/Akt y liberación del NO en individuos sanos (Kim et al., 2006). En estados de resistencia a la insulina, se ha descrito la alteración selectiva de la vía de la PI3K/Akt en los vasos sanguíneos (Jiang et al., 1999), y además, la existencia de hiperinsulinemia compensadora activa la vía de la MAPK incrementando más aún las acciones pro-hipertensivas y pro-aterogénicas de la hormona (Kim et al., 2006). En el presente estudio, la inhibición de la MAPK incrementó de forma marcada el efecto relajante de la insulina en arterias peneanas de RZO hiperinsulinémicas, pero no en RZL (Figura 23A y B), lo que sugiere que la insulina tiene efectos vasoconstrictores mediados por la vía de las MAPK bajo condiciones de resistencia a la insulina, que probablemente son desenmascarados por la alteración de la vía de la PI3K/eNOS. Sin embargo, el bloqueo de los receptores de ET-1 no modificó la respuesta relajante a la insulina en arterias peneanas de RZL ni de RZO (Figura 24). Estos datos difieren de los hallazgos descritos en arterias del músculo esquelético, donde la insulina carece de efecto vasoactivo neto en arterias de RZL, aunque el antagonismo de los receptores de ET-1 desenmascara una vasodilatación e inhibe la vasoconstricción inducida por la insulina en arterias de animales sanos (Eringa et al., 2007). Estas discrepancias entre nuestros resultados en arterias peneanas y los de Eringa y colaboradores (2007) en arterias del

músculo esquelético, probablemente reflejan las diferencias en la regulación del flujo sanguíneo por la insulina específicas de cada tejido. Como se ha discutido anteriormente, en la caracterización de las vías de señalización de la insulina en las arterias coronarias de los mismos animales, no se observó modificación alguna en los efectos relajantes de la insulina tras la inhibición de las MAPK, por lo que se descarta la participación de esta vía en el efecto que induce la hormona sobre el tono arterial coronario, aunque la insulina sí produjo la activación de la vía MAPK, lo que probablemente está relacionado con otras acciones mitogénicas de la hormona. Estas observaciones confirman que los mecanismos implicados en la regulación del flujo sanguíneo por la insulina probablemente varían dependiendo del territorio vascular.

Por otra parte, las respuestas relajantes desenmascaradas por el bloqueo de la MAPK en arterias peneanas de RZO fueron inhibidas por la combinación del bloqueo de la NOS y de la enzima ciclooxygenasa (Figura 23D), lo que sugiere que la liberación de prostanoïdes relajantes probablemente compensa la alteración de la vía vasodilatadora de la PI3K/NO en las arterias peneanas bajo condiciones de resistencia a la insulina. Un estudio realizado en el cuerpo cavernoso del conejo demostró que la prostaciclina estaba involucrada en la relajación dependiente del endotelio inducida por la insulina en animales sanos, y no la liberación de NO (Myung et al., 2006), mientras que en las arterias peneanas de RZL sanas, esta relajación es principalmente debida a la liberación de NO, lo que sugiere la existencia de diferencias en las vías de señalización de la insulina también entre los distintos tejidos eréctiles del pene. Además, en arterias mesentéricas pequeñas de ratas *Wistar*, la relajación inducida por la insulina dependiente del endotelio vascular no fue afectada por los inhibidores de la NOS y sí por el bloqueo de la ciclooxygenasa, siendo la prostaciclina el compuesto relajante implicado (Miller et al., 2002). Estos datos indican también diferencias de las vías de señalización de la insulina entre los diferentes lechos vasculares, tanto en animales sanos como en animales con resistencia a la insulina.

Estudios anteriores han demostrado que en las células del músculo liso vascular la insulina disminuye la contractibilidad regulando el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico producido por agonistas a través de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje (Kahn et al., 1994; Standley et al., 1991, 1993) y alterando la actividad en las fosfatasa de las cadenas ligeras de miosina (Begum et al., 2002). También se ha descrito que las respuestas relajantes a la insulina en el cuerpo cavernoso se deben a la inhibición de los canales de calcio tipo-L (Myung et al., 2006). Los datos obtenidos en el presente estudio demuestran que los efectos vasodilatadores de la

insulina son paralelos a la disminución en las  $[Ca^{2+}]_i$  en músculo liso de arterias precontraídas con fenilefrina de animales sanos (Figura 18A y B). Debido a que la vasoconstricción inducida por los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos depende mayoritariamente de la entrada de  $Ca^{2+}$  extracelular en las arterias peneanas (Villalba et al., 2007), probablemente el efecto de la insulina sobre la  $[Ca^{2+}]_i$ , se debe a la atenuación en la entrada de  $Ca^{2+}$ . La disminución de la  $[Ca^{2+}]_i$  que provoca la insulina se encontró atenuada, e incluso se convirtió en incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  de forma simultánea al descenso de la relajación en las arterias peneanas de animales obesos con resistencia a la insulina (Figura 18C y D). Sin embargo, en células de músculo liso vascular de aorta aisladas de RZO, la entrada de  $Ca^{2+}$  inducida por vasopresina fue atenuada por la insulina de manera similar en RZL y en RZO, lo que sugiere que la capacidad de la insulina para reducir la entrada de  $Ca^{2+}$  en las células del músculo liso vascular, se encuentra preservada bajo condiciones de resistencia a la insulina (Standley et al., 1993). Los resultados de nuestro estudio se realizaron en arterias con endotelio intacto, por lo que la alteración de los efectos de la insulina en la  $[Ca^{2+}]_i$  de las arterias peneanas de RZO, probablemente refleja el deterioro en la liberación/efectos del NO endotelial que media la relajación inducida por la insulina. De acuerdo con estas observaciones, las relajaciones inducidas por la ACh, que están mediadas por el NO y los prostanoïdes (Villalba et al., 2009; Sánchez et al., 2010) también estuvieron alteradas junto con la disminución de la  $[Ca^{2+}]_i$  en las arterias peneanas de RZO.

En resumen, estos resultados en las arterias peneanas demuestran que los efectos relajantes de la insulina se encuentran atenuados debido a la alteración en la liberación de NO a través de la vía PI3K/eNOS en las arterias peneanas de RZO, un modelo de resistencia a la insulina y Síndrome Metabólico asociado a la DE. Esta disfunción endotelial afecta, además, a la vasodilatación mediada por los receptores  $\beta$ -adrenérgicos y se correlaciona con anormalidades estructurales de las arterias peneanas. Por ello, la resistencia a la insulina en la vasculatura peneana contribuye probablemente a la disfunción endotelial observada en estados de resistencia a la insulina, como diabetes, obesidad e hipertensión, los cuales actúan como factores de riesgo independientes, y en conjunto, incrementan el riesgo de DE.

### 3. PAPEL DE LA ENDOTELINA EN LA REACTIVIDAD ALTERADA DE LAS ARTERIAS PENEANAS BAJO CONDICIONES DE RESISTENCIA A LA INSULINA

La disfunción endotelial observada en estados de obesidad y diabetes mellitus tipo 2 ha sido atribuida a la disminución en la disponibilidad de NO (McVeigh et al., 1992; Steinberg et al., 2000a), probablemente debido a alteraciones en su producción o al incremento de su inactivación por factores como el estrés oxidativo (Honing et al., 1998; Rabini et al., 1998). Sin embargo, el control paracrino del tono vascular depende del equilibrio entre factores vasodilatadores y los factores vasoconstrictores (Vane et al., 1990). La ET-1, producida por las células del endotelio vascular, es uno de los vasoconstrictores más potentes y de mayor importancia producido localmente en la pared vascular. Las funciones de la ET-1 y el NO se antagonizan y su balance determinará el tono vascular, existiendo importantes interacciones directas a nivel de las señales de expresión, transcripción y traducción genéticas (Goligorsky et al., 1994), lo que hace que dichos factores endoteliales actúen como limitantes de la producción neta el uno del otro. Este antagonismo funcional puede explicar los desequilibrios resultantes en condiciones de resistencia a la insulina o hiperinsulinemia. El NO posee efectos antiateroscleróticos, y por el contrario, la ET-1 posee efectos proateroscleróticos, mediados a través de la modulación de la actividad plaquetaria, oxidación lipídica, quimiotaxis de leucotrienos y producción local de factores trombóticos como son los factores de crecimiento y de proliferación vascular de las células del músculo liso (Levin, 1995; De Meyer y Herman, 1997; Moncada y Higgs, 1993).

El desequilibrio entre las acciones del NO y de la ET-1 que se produce durante la obesidad y el *Síndrome Metabólico* es un factor clave de la disfunción endotelial. Así, se descrito que los niveles circulantes de ET están incrementados en estados de resistencia a la insulina como la diabetes tipo 2 y la obesidad (Caballero et al., 1999), y que el aumento de la actividad endógena de la ET contribuye a la disfunción endotelial característica de estos estados (Mather et al., 2002, 2004). En individuos obesos, se ha sugerido que el incremento de la actividad de la ET endógena contribuye a la resistencia a la insulina en el músculo esquelético a través defectos tanto vasculares, disminuyendo el flujo sanguíneo tisular, como metabólicos, disminuyendo la captación de glucosa (Lteif et al., 2007).

### 3.1. Efecto de la ET-1 en arterias peneanas bajo condiciones de Síndrome Metabólico

A pesar de haberse descartado inicialmente, tras caracterizar la vía de las MAPK, una participación de la ET-1 en las acciones de la insulina sobre el tono arterial y en la disfunción endotelial de arterias peneanas de RZO, en el presente estudio se han evaluado los efectos de la ET-1, y se han caracterizado y localizado sus receptores ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub> en la pared arterial peneana de este modelo animal de Síndrome Metabólico, ya que permanecen aún sin clarificar. El efecto de la ET-1 no fue significativamente diferente en las arterias peneanas de animales sanos y obesos, a pesar de existir una ligera tendencia a la vasoconstricción aumentada en arterias de RZO (Figura 25), lo que contrasta con los estudios llevados a cabo en el cuerpo cavernoso del mismo modelo animal, donde la contracción a la ET-1 sí estuvo significativamente incrementada en RZO con respecto a RZL (Wingard et al., 2007). En la misma línea, experimentos realizados en cuerpo cavernoso de un modelo de ratas con hipertensión inducida por desoxicorticosterona y sal (DOCA) demostraron que la contractilidad a la ET-1 estaba incrementada por lo que podría contribuir a la DE en este modelo, que a su vez podía prevenirse mediante el tratamiento con antagonistas del receptor ET<sub>A</sub> (Carneiro et al., 2008). La implicación del receptor ET<sub>A</sub> en la vasoconstricción de la ET-1 en el tejido eréctil ha sido previamente demostrada en estudios *in vitro* en los que las respuestas contráctiles inducidas por la ET-1 en tiras de cuerpo cavernoso son abolidas por el bloqueo del receptor ET<sub>A</sub> (Wingard et al., 2003), y por la falta de efecto de la administración de antagonistas ET<sub>B</sub> sobre la contracción a la ET-1 *in vivo* (Dai et al., 2000).

Los resultados en arterias peneanas difieren de lo observado en otros lechos arteriales y otros modelos de enfermedad vascular. Así, en el músculo liso de arterias coronarias de un modelo de diabetes tipo 2, la respuesta contráctil inducida por ET-1 estuvo incrementada principalmente a través de receptores ET<sub>B</sub> localizados a nivel muscular (Bender y Klabunde, 2007). En arterias basílicas de la rata Goto-Kakizaki (GK), un modelo de diabetes tipo 2, Sachidanandam y colaboradores (2006) observaron que la contracción inducida por la ET tampoco estuvo modificada con respecto a los controles sanos, a pesar de que sí estaba aumentada significativamente en la arteria mesentérica del mismo modelo animal por un incremento en la expresión de los receptores ET<sub>A</sub> contráctiles (Harris et al., 2008; Sachidanandam et al., 2006). En arterias coronarias de ratas Zucker se han evaluado los efectos vasoactivos y movimientos de  $[Ca^{2+}]_i$ , así como los receptores de ET-1 implicados,



demostrándose que la ET-1 induce menor vasoconstricción en RZO que en RZL, lo que se asocia a una marcada disminución en el incremento en la de  $[Ca^{2+}]_i$  inducido por este agente, mediada por receptores de endotelina  $ET_B$  (Katakam et al., 2006). Estos resultados concuerdan con la preservación de la respuesta relajante a la insulina que hemos demostrado previamente en el lecho vascular coronario de RZO donde la vía vasodilatadora está aumentada y la vasoconstrictora está disminuida (Contreras et al., 2011). En estudios previos también observamos que en arterias coronarias de la RZO existe una mayor producción de prostanoïdes relajantes mediados por la vía COX-2 (Sánchez et al., 2010), lo que confirma que este lecho arterial está inicialmente protegido mediante mecanismos compensadores en condiciones de resistencia a la insulina.

### 3.2. Papel del $Ca^{2+}$ en la vasoconstricción mediada por la ET-1 bajo condiciones de Síndrome Metabólico

La contracción del músculo liso se inicia por elevación de la concentración de  $Ca^{2+}$  libre en el citosol celular, bien debida a la entrada directa de  $Ca^{2+}$  desde el espacio extracelular o bien a su liberación de los depósitos intracelulares, fundamentalmente el retículo sarcoplásmico. La interacción del  $Ca^{2+}$  con la proteína CaM desencadena la formación de puentes cruzados actina-miosina provocando la contracción muscular (Somlyo y Somlyo, 1994, 2000, 2003). Sin embargo, numerosos estudios han demostrado que en la contracción en el músculo liso participan también otros mecanismos independientes del  $Ca^{2+}$  denominados mecanismos de “sensibilización al  $Ca^{2+}$ ”, en los que están implicadas las cinasas Rho y/o PKC. La RhoK fosforila a MLCP, impidiendo su actividad, promoviendo así la contracción del músculo liso vascular sin modificaciones en la  $[Ca^{2+}]_i$  (Somlyo y Somlyo, 2000).

En arterias peneanas de animales sanos la contracción a las concentraciones bajas de ET-1 estuvo asociada con incrementos de la  $[Ca^{2+}]_i$ , mientras que a dosis más elevadas el desarrollo de fuerza no estuvo acompañado de incrementos en la  $[Ca^{2+}]_i$  (Figura 26A y B), lo que indica la participación de mecanismos de sensibilización al  $Ca^{2+}$ , que generalmente han sido asociados a la actividad de las enzimas PKC y RhoK (Villalba et al., 2007).

En arterias peneanas de RZO, la vasoconstricción ligeramente incrementada inducida por ET-1 estuvo acompañada por una elevación marcada del  $Ca^{2+}$  intracelular (Figura 26C y D), y el análisis de las relaciones  $[Ca^{2+}]_i$ /tensión para la ET-1 en arterias de RZO desveló un

desplazamiento hacia la derecha de dicha relación en comparación con la de arterias de animales sanos (Figura 29A), indicando un descenso en los procesos de sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$  mediados por la ET-1 en condiciones de resistencia a la insulina (Figura 28A y B). Estos resultados difieren de los observados en el presente estudio para la vasoconstricción aumentada inducida por activación del receptor TP en arterias peneanas de ratas obesas, que estuvo acoplada a un incremento paralelo de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Figura 27, Figura 28C y D, Figura 29B), y contrasta, asimismo, con lo observado para la contracción  $\alpha_1$ -adrenérgica que se encuentra acoplada a mecanismos de sensibilización con una menor entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en estas mismas arterias (Villalba et al., 2011). Estas observaciones indican que los cambios en el metabolismo del  $\text{Ca}^{2+}$  y asociados a la vasoconstricción peneana son específicos para cada receptor bajo condiciones de Síndrome Metabólico.

Tradicionalmente se ha asociado el incremento de la vasoconstricción inducida por ET-1 a un aumento de la sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$  en modelos de enfermedad cardiovascular (Lerman y Zeiher, 2005), y de forma específica, en los cuerpos cavernosos de la RZO la mayor contracción inducida por ET-1 fue paralela al incremento de la expresión de las enzimas RhoK y PKC y fue inhibida por bloqueantes de estas enzimas, indicando inicialmente un incremento de los procesos de sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$  mediados por la ET-1 (Wingard et al., 2007). En el presente estudio, sin embargo, si bien los mecanismos de sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$  se mantienen en RZO (Figura 26), una fracción del incremento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  no estaría asociado con el proceso de contracción ni con la maquinaria contráctil. Estos hallazgos podrían interpretarse en contexto con estudios realizados en células de músculo liso coronario de cerdos diabéticos/dislipémicos, donde el incremento del  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en respuesta a la ET-1 fue mayor que en los controles sanos (Lee et al., 2003). Estos estudios demostraron también en el mismo modelo porcino que la ET-1 induce un incremento del  $\text{Ca}^{2+}$  perinuclear en miocitos de arterias coronarias, lo que sugiere que ese  $\text{Ca}^{2+}$  está probablemente asociado con la activación de la transcripción y con procesos de proliferación celular y remodelado de la pared vascular (Wamhoff et al., 2002). El acoplamiento entre la entrada capacitativa de  $\text{Ca}^{2+}$  y las funciones de tipo no contráctil en las células del músculo liso vascular se relaciona con procesos de expresión génica (Fleming et al., 2002; Fleming et al., 2003). Así, la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  aumentada ha sido asociada con la proliferación celular en miocitos pulmonares humanos (Golovina, 1999), y se ha demostrado un incremento marcado en la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en las células musculares lisas de ratas hipertensas, lo que sugiere también un papel importante en el remodelado vascular (Fellner y Arendshorst, 2002).

EL remodelado vascular es un proceso activo, generalmente adaptativo, de cambios estructurales que involucran al crecimiento, muerte, proliferación y migración celular y la producción o degradación de sustancias de la matriz extracelular arterial, todo lo cual es regulado dinámicamente por la interacción de factores de crecimiento, sustancias vasoactivas y estímulos hemodinámicos (Gibbons y Dzau, 1994). Se caracteriza por hiperplasia vascular, que se debe a la proliferación de células musculares lisas como respuesta a la estimulación por factores tróficos neurohormonales, e hipertrofia vascular, como consecuencia de la deposición de matriz extracelular en la pared de los vasos, disminuyendo el lumen vascular, contribuyendo ambas al desarrollo de complicaciones microvasculares en la diabetes (Rumble et al., 1997; Harris et al., 2005). Está bien establecido que la ET-1, además de sus acciones como agente vasoconstrictor, tiene propiedades mitogénicas y de proliferación celular, y existen estudios que apuntan a los receptores ET<sub>A</sub> como responsables de ambas acciones (Sachidanandam et al., 2007; Sutherland et al., 2008), mientras que, por el contrario a los receptores ET<sub>B</sub>, concretamente los ET<sub>B</sub> de localización endotelial, se les ha atribuido un papel vasodilatador y vasculo-protector (Murakoshi et al., 2002), como se ha demostrado en el lecho mesentérico (Sachidanandam et al., 2007) y en el remodelado cerebrovascular (Kelly-Cobbs et al., 2010) de ratas diabéticas, ya que los receptores ET<sub>B</sub> musculares producen efectos similares a los receptores ET<sub>A</sub> (Schneider et al., 2007; Pollock et al., 2010). Por el contrario, otros autores han descrito en células endoteliales umbilicales humanas que la proliferación celular es mediada por los receptores ET<sub>B</sub> (Dong et al., 2005). Por lo tanto, la ET-1 juega un papel importante en el remodelado vascular durante estados de Síndrome Metabólico y diabetes, aunque sus mecanismos no están suficientemente clarificados. En el presente estudio el incremento de  $[Ca^{2+}]_i$  activado por ET-1 y no asociado a vasoconstricción (Figura 26) se correlacionó con la presencia de remodelado vascular en las arterias penéneas de ratas RZO (Figura 1) (Villalba et al., 2009), lo que probablemente indica que el metabolismo y los movimientos del  $Ca^{2+}$  intracelular están desviados a procesos de crecimiento y proliferación celular.

### 3.3. Localización, distribución y efectos de los receptores de endotelina bajo condiciones de Síndrome Metabólico

Tradicionalmente se ha descrito que los receptores ET<sub>A</sub> se localizan principalmente en el músculo liso vascular de la pared arterial donde median una potente vasoconstricción, mientras que el receptor ET<sub>B</sub> puede localizarse tanto en las células endoteliales donde media vasodilatación, como en el músculo liso vascular donde se le han atribuido acciones contráctiles (Böhm y Pernow, 2007). El incremento en la contracción inducida por ET-1 encontrada en patologías cardiovasculares se ha atribuido al receptor ET<sub>A</sub> (Carneiro et al., 2008; Harris et al., 2008; Mather et al., 2002; Sachidanandam et al., 2008) aunque algunos estudios implican también al receptor ET<sub>B</sub> del músculo liso (Dong et al., 2005; Nilson et al., 2008), mientras que todos los efectos vasoprotectores han sido adscritos al receptor ET<sub>B</sub> endotelial (Kelly-Cobbs et al., 2010; Prasad et al., 2005; Sachidanandam et al., 2007).

En el presente estudio la retirada mecánica del endotelio incrementó la respuesta contráctil a altas concentraciones de ET-1, ligeramente en RZL, y de forma más marcada en RZO (Figura 30), lo cual indica la presencia de un receptor relajante de baja afinidad que contrarresta el efecto contráctil de la ET-1 de forma más pronunciada en arterias de animales obesos y cuya actividad está incrementada en animales obesos, si bien la mayor parte del efecto contráctil de la ET-1 se debe a receptores localizados en el músculo liso arterial.

El antagonismo selectivo de los receptores ET<sub>A</sub> produjo un desplazamiento competitivo hacia la derecha de la respuesta contráctil a la ET-1, poniendo de manifiesto la presencia de receptores ET<sub>A</sub> contráctiles en las arterias peneanas tanto de RZL como de RZO (Figura 32A y B). Sin embargo el desplazamiento producido por el antagonista no selectivo de los receptores ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub> con bosentán fue mayor que con el bloqueo del receptor ET<sub>A</sub> sólo (Figura 31 y Figura 33), lo que sugiere que los receptores ET<sub>B</sub> pueden estar también implicados en la respuesta contráctil de la ET-1. En arterias desprovistas de endotelio, el bloqueo de los receptores ET<sub>A</sub> causó la misma inhibición del efecto contráctil que en arterias con endotelio intacto, indicando que una parte importante de estos receptores ET<sub>A</sub> contráctiles están localizados a nivel del músculo liso vascular (Figura 32). En las arterias de animales obesos se observaron resultados similares con el antagonismo de los receptores ET<sub>A</sub>, ya que inhibió de forma competitiva la contracción en arterias con endotelio, manteniéndose la inhibición en arterias peneanas desprovistas del endotelio vascular. La localización del receptor ET<sub>A</sub> predominantemente en el

músculo liso vascular de arterias peneanas de RZL y de RZO se confirmó mediante el marcaje inmunocitoquímico (Figura 37). Ni los resultados farmacológicos, ni los del estudio inmunocitoquímico permite deducir una mayor participación de los receptores  $ET_A$  en la respuesta vasoconstrictora en arterias de RZO. Estos resultados difieren en parte de los descritos por Wingard y colaboradores (2007) en el cuerpo cavernoso de RZO, donde observó una mayor vasoconstricción a la ET-1 adscrita a receptores  $ET_A$ , así como en otros modelos de arterias periféricas donde concluyen que estos receptores sí están involucrados en la vasoconstricción arterial incrementada en el curso de la diabetes mellitus tipo 2 (Sachidanandam et al., 2008). Por el contrario, y de acuerdo con nuestros hallazgos, en arterias coronarias de RZO no se encontraron diferencias en la expresión de los receptores  $ET_A$  con respecto a RZL (Katakam et al., 2006).

Evidencias crecientes sugieren que el balance de los receptores de ET-1 en la los vasos sanguíneos podría inclinarse hacia el fenotipo  $ET_B$  contráctil bajo circunstancias patológicas (Alabadi et al., 2004; Ikeda et al., 2001; Matsumoto et al., 2004; Ortmann et al., 2004; Stenman et al., 2002). En el presente trabajo, en las arterias peneanas de RZL, el antagonismo de los receptores  $ET_B$  con BQ-788 produjo un ligero aumento de la respuesta vasoconstrictora a dosis elevadas de ET-1 en arterias de RZL con endotelio intacto, que resultó similar al afecto producido por la retirada mecánica del endotelio. Sin embargo, no se observó efecto alguno del antagonismo de los receptores  $ET_B$  en las contracciones a la ET-1 en arterias desprovistas del endotelio vascular, lo que sugiere la presencia de una pequeña población de receptores  $ET_B$  de baja afinidad con efecto relajante en el endotelio que modularía la contracción de la ET-1 en las arterias peneanas en condiciones fisiológicas (Figura 34A y C). Además, el agonista selectivo de los receptores  $ET_B$  BQ-3020 indujo una modesta relajación en arterias peneanas precontraídas con Phe con el endotelio vascular intacto (Figura 35, RZL). La presencia de un receptor relajante  $ET_B$  en el endotelio de las arterias sanas se confirma con las medidas de  $[Ca^{2+}]_i$  que demuestran que el antagonista de los receptores  $ET_B$  incrementa la entrada de  $Ca^{2+}$  inducida por la ET-1 en arterias de RZL con endotelio intacto, lo que indica la presencia de un receptor  $ET_B$  inhibidor de la entrada de  $Ca^{2+}$  y de la contracción (Figura 36A). Por otra parte, el estudio inmunocitoquímico confirma la presencia de receptores  $ET_B$  en el endotelio vascular de RZL (Figura 37), lo que estaría de acuerdo con estudios previos que demuestran la presencia del receptor  $ET_B$  con efecto relajante a nivel endotelial en diferentes lechos vasculares (DeNucci et al., 1988; Katakam et al., 2005; Liu et al., 2003; Tirapelli et al., 2005).

En las arterias peneanas de RZO, el bloqueo selectivo de los receptores  $ET_B$  no modificó la respuesta vasoconstrictora de la ET-1 en arterias con endotelio intacto, y únicamente se observó un efecto inhibidor de la vasoconstricción a elevadas concentraciones de ET-1 por el antagonismo de los receptores  $ET_B$  en arterias desprovistas de endotelio (Figura 34B y D). Estos datos sugieren la presencia de receptores  $ET_B$  contráctiles en el músculo liso vascular, mientras que la falta de efecto del antagonista en arterias con endotelio intacto, sugiere la posible presencia de receptores  $ET_B$  relajantes en el endotelio, y  $ET_B$  contráctiles en el músculo, que contrarrestan sus efectos, resultando un efecto vasoactivo neto nulo. Estos datos se confirman por la falta de efecto del agonista  $ET_B$  (BQ-3020) en arterias precontraídas con el endotelio intacto, mientras que en vasos desprovistos de endotelio ejerce un efecto contráctil sobre la tensión basal (Figura 35, RZO). Además, el estudio inmunocitoquímico confirmó la presencia de receptores  $ET_B$  tanto en el endotelio como en el músculo liso en arterias peneanas de RZO (Figura 37). Así mismo, el antagonismo selectivo de los receptores  $ET_B$  redujo de forma significativa los incrementos de  $[Ca^{2+}]_i$  inducidos por ET-1 (Figura 36B), lo que confirma que los receptores  $ET_B$  están implicados en la mayor entrada de  $Ca^{2+}$  observada en arterias de animales obesos. Estudios posteriores son necesarios para clarificar la contribución relativa de estos incrementos de  $[Ca^{2+}]_i$  mediados por el receptor  $ET_B$  a los procesos de contracción y/proliferación en la pared vascular. Nuestros resultados que demuestran una mayor actividad de un receptor  $ET_B$  de localización muscular y asociado a una mayor vasoconstricción y aumento del  $[Ca^{2+}]_i$  difieren de los hallazgos obtenidos en arterias coronarias de la RZO, donde los incrementos de la  $[Ca^{2+}]_i$  inducidos por la ET-1 no sólo fueron menores con respecto a los controles sanos, sino que este mecanismo regulador estuvo asociado al incremento de la actividad de receptores  $ET_B$  relajantes endoteliales (Katakam et al., 2005).

En conjunto, estos resultados ponen de manifiesto la implicación de un receptor  $ET_B$  contráctil en el músculo liso de arterias peneanas durante el Síndrome Metabólico y obesidad, no presente bajo condiciones fisiológicas. Nuestros hallazgos son consistentes con estudios recientes realizados en arterias coronarias de un modelo experimental de ratas con diabetes mellitus tipo 2 y obesidad (Bender y Klabunde, 2007) y en la arteria mamaria humana sometida a bypass (Nilson et al., 2008) en los cuales los receptores  $ET_B$  de efecto contráctil se encontraban regulados a la alta en situaciones patológicas. Sin embargo, difieren de los descritos en cuerpo cavernoso del mismo modelo experimental (Wingard et al., 2007), y de otras arterias periféricas de modelos de Síndrome Metabólico/obesidad/diabetes mellitus tipo 2, en los cuales el incremento del efecto contráctil de la ET-1 fue adscrito al receptor  $ET_A$ .

(Carneiro et al., 2008; Harris et al., 2008; Mather et al., 2002; Sachidanandam et al., 2008), y no al ET<sub>B</sub>.

En el estudio inmunocitoquímico, cabe destacar la amplia presencia de receptores tanto ET<sub>A</sub> como ET<sub>B</sub> en las fibras nerviosas perivasculares a nivel de la capa adventicia de las arterias peneanas de RZL y de RZO (Figura 37). Así, los experimentos funcionales con guanetidina, una neurotoxina selectiva de los nervios adrenérgicos, confirman que la ET-1 induce la liberación de noradrenalina de los nervios lo que contribuye a su efecto vasoconstrictor (Figura 38C y D). Por otra parte el bloqueo de la NOS produce un marcado incremento de la contracción a dosis bajas de ET-1 en arterias de RZL y de RZO, indicando la liberación de NO relajante inducido por ET-1 mediante receptores de ET-1 de alta afinidad (Figura 38A y B). Este efecto potenciador no fue reproducido por la retirada mecánica del endotelio (Figura 30), lo que sugiere que la ET-1 libera NO de origen nervioso. En este aspecto, se necesitan más estudios en un futuro para determinar el subtipo de receptores que media la liberación selectiva de NO y/o noradrenalina de los nervios perivasculares en las arterias peneanas de RZL y RZO. Estudios previos llevados a cabo en la arteria peneana y en el músculo retractor peneano bovino, utilizando técnicas de binding, sugieren la presencia de receptores ET<sub>B</sub> neuronales localizados en las fibras nerviosas independientemente de la naturaleza de los nervios eferentes (Parkkisenniemi et al., 2000).

En definitiva, estos datos indican que aunque aparentemente no existen diferencias en los efectos contráctiles que la ET-1 induce en las arterias peneanas de RZL y de RZO, sí existen variaciones en la distribución y localización de los receptores de endotelina ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub> bajo condiciones de Síndrome Metabólico, y se desvela una población de receptores ET<sub>B</sub> a nivel del músculo liso vascular, no presentes bajo condiciones fisiológicas, que median vasoconstricción, y probablemente también una mayor entrada de Ca<sup>2+</sup> no destinado a la maquinaria contráctil, sino a procesos de remodelado vascular observados en las arterias penenanas de este modelo experimental.



## **VI. CONCLUSIONES**





En el presente estudio se han evaluado los efectos de la resistencia a la insulina en las arterias coronarias y peneanas de un modelo experimental de obesidad genética/Síndrome Metabólico. De los resultados obtenidos se pueden deducir las siguientes conclusiones:

1. El efecto relajante dependiente del endotelio de la insulina es más relevante en arterias coronarias distales intramiocárdicas y está preservado en RZO. Por el contrario, la relajación inducida por la insulina está alterada en arterias peneanas del mismo modelo de resistencia a la insulina.
2. El efecto vasodilatador de la insulina está mediado por la activación de la vía PI3K/Akt y por un incremento de la expresión de la enzima Akt en arterias coronarias de animales sanos. La activación de dicha vía se encuentra preservada en arterias coronarias de animales obesos, estando la actividad basal de la enzima Akt regulada a la alta en dichos animales. Por el contrario, la relajación reducida de la insulina en arterias peneanas de RZO es debida, en parte, a la menor activación de la enzima PI3K.
3. El incremento de la actividad de la vía PI3K/Akt preserva las relajaciones  $\beta$ -adrenérgicas en las arterias coronarias de RZO, mientras que la alteración de esta vía provoca una reducción significativa del efecto vasodilatador  $\beta$ -adrenérgico en las arterias peneanas de animales obesos.
4. La relajación inducida por la insulina es debida a la liberación de NO en arterias coronarias tanto de RZL como de RZO, estando la actividad basal de la enzima eNOS regulada a la alta en animales obesos. Por el contrario, la liberación de NO por la insulina está alterada en arterias peneanas de los mismos animales.
5. Ni la activación de la enzima MAPK, ni la activación de los receptores contráctiles de la ET-1, tienen un papel relevante en el efecto vasoactivo de la insulina en las arterias coronarias, a pesar de que la actividad MAPK tanto basal como estimulada por insulina estuvieron reducidas de forma significativa en arterias coronarias de animales obesos, lo que probablemente afecta a las acciones proliferativas vinculadas a esta vía de señalización activada por la hormona.
6. Ni la activación de la MAPK, ni la activación de receptores contráctiles de ET-1 están implicados en el efecto vasoactivo de la insulina en arterias peneanas de animales sanos. En arterias de animales obesos, la actividad incrementada de la MAPK da lugar a un

compuesto contráctil cuyo efecto es compensado por la producción de prostanoides relajantes.

7. A concentraciones suprafisiológicas, los ácidos grasos libres no afectan ni a las relajaciones dependientes del endotelio, ni a la activación producida por la insulina de las enzimas eNOS y Akt, pero reducen de forma significativa tanto la actividad MAPK basal como la estimulada por insulina en las arterias coronarias de animales sanos, lo que podría explicar la alteración de esta vía en animales obesos.
8. La ET-1 induce una vasoconstricción de magnitud similar en arterias peneanas de RZL y de RZO, a pesar de que provoca un incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  de mayor magnitud en animales obesos, a diferencia de lo que ocurre con otros agonistas vasoconstrictores como el  $TxA_2$ , cuya vasoconstricción incrementada está asociada a un aumento paralelo de la  $[Ca^{2+}]_i$ . El aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$  no acoplado a la contracción inducida por ET-1 está probablemente relacionado con procesos de remodelado de la pared vascular.
9. El efecto vasoconstrictor de la ET-1 está mediado fundamentalmente por receptores  $ET_A$  de localización muscular en arterias peneanas de animales control, mientras que en arterias de animales obesos existe además una participación de receptores  $ET_B$  de naturaleza contráctil localizados en el músculo liso y acoplados al incremento de las  $[Ca^{2+}]_i$ .

**Conclusión final:** De los resultados obtenidos podemos concluir que la resistencia a la insulina afecta de forma heterogénea al lecho arterial peneano y al coronario en condiciones de obesidad genética/Síndrome Metabólico. Así, mientras que en las arterias peneanas existe una disminución de la producción de NO endotelial dependiente de la vía de la PI3K/Akt, en las arterias coronarias las relajaciones endoteliales mediadas por esta vía se encuentran preservadas a expensas de una regulación a la alta de la actividad Akt/eNOS y de una reducción de la actividad de la vía vasoconstrictora/proaterogénica de la MAPK. La disfunción endotelial de las arterias peneanas probablemente explica la DE asociada con estados de resistencia a la insulina como son la diabetes y la obesidad. Además, la aparición de resistencia vascular a la insulina asociada a disfunción endotelial en el lecho arterial peneano antes de que se detecte dicha resistencia en las arterias coronarias, apoya la evidencia clínica de que la DE puede considerarse como un centinela de enfermedad arterial coronaria subclínica.



## VII. BIBLIOGRAFÍA



- Abe H, Yamada N, Kamata K, Kuwaki T, Shimada M, Osuga J, Shionoiri F, Yahagi N, Kadowaki T, Tamemoto H, Ishibashi S, Yazaki Y, Makuuchi M. (1998) Hypertension, hypertriglyceridemia, and impaired endothelium-dependent vascular relaxation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *J Clin Invest.* 101(8):1784-1788.
- Abel ED, Litwin SE, Sweeney G. (2008) Cardiac remodeling in obesity. *Physiol Rev.* 88(2):389-419.
- Aboseif SR, Lue TF. (1988) Hemodynamics of penile erection. *Urol. Clin.* 15:1-7.
- Ajuwon KM, Spurlock ME. (2005) Palmitate activates the NF-kappaB transcription factor and induces IL-6 and TNFalpha expression in 3T3-L1 adipocytes. *J Nutr.* 135:1841-1846.
- Akingba AG, Burnett AL. (2001) Endothelial nitric oxide synthase protein expression, localization, and activity in the penis of the alloxan-induced diabetic rat. *Mol Urol.* 5(4):189-197.
- Alabadí JA, Miranda FJ, Lloréns S, Centeno JM, Marrachelli VG, Alborch E. (2004) Mechanisms underlying diabetes enhancement of endothelin-1-induced contraction in rabbit basilar artery. *Eur J Pharmacol.* 486(3):289-296.
- Al-Delaimy WK, Merchant AT, Rimm EB, Willett WC, Stampfer MJ, Hu FB. (2004) Effect of type 2 diabetes and its duration on the risk of peripheral arterial disease among men. *Am J Med.* 116(4):236-240.
- Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, Cohen P. (1997) Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr Biol.* 7:261-269.
- Alexander CM, Landsman PB, Teutsch SM, Haffner SM; Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III); National Cholesterol Education Program (NCEP). (2003) NCEP-defined metabolic syndrome, diabetes, and prevalence of coronary heart disease among NHANES III participants age 50 years and older. *Diabetes.* 52(5):1210-1214.
- Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. (1993) Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90(17):7915-7922.
- Anderson HD, Rahmutula D, Gardner DG. (2004) Tumor necrosis factor-alpha inhibits endothelial nitric oxide synthase gene promoter activity in bovine aortic endothelial cells. *J Biol Chem.* 279(2):963-969.
- Andersson KE (2001) Pharmacology of penile erection.. *Pharmacol Rev.* 53(3):417-450.
- Andersson KE, Wagner G. (1995) Physiology of penile erection. *Physiol Rev.* 75(1):191-236.
- Anderson TJ, Uehata A, Gerhard MD, Meredith IT, Knab S, Delagrang D, Lieberman EH, Ganz P, Creager MA, Yeung AC, et al. (1995) Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations. *J Am Coll Cardiol.* 26(5):1235-1241.
- Anfossi G, Massucco P, Mattiello L, Balbo A, Russo I, Doronzo G, Rolle L, Ghigo D, Fontana D, Bosia A, Trovati M. (2002) Insulin influences the nitric oxide cyclic nucleotide pathway in cultured human smooth muscle cells from corpus cavernosum by rapidly activating a constitutive nitric oxide synthase. *Eur J Endocrinol.* 147(5):689-700.
- Angulo J, Cuevas P, Fernández A, Gabancho S, Allona A, Martín-Morales A, Moncada I, Videla S, Sáenz de Tejada I. (2003) Diabetes impairs endothelium-dependent relaxation of human penile vascular tissues mediated by NO and EDHF. *Biochem Biophys Res Commun.* 26;312(4):1202-1208.
- Arcaro G, Cretti A, Balzano S, Lechi A, Muggeo M, Bonora E, Bonadonna RC. (2002) Insulin causes endothelial dysfunction in humans: sites and mechanisms. *Circulation.* 105(5):576-582.

- Ari G, Vardi Y, Hoffman A, Finberg JP. (1996) Possible role for endothelins in penile erection. *Eur J Pharmacol.* 307(1):69-74.
- Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. (1997) Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science.* 275(5302):964-967.
- Awad O, Jiao C, Ma N, Dunnwald M, Schatteman GC. (2005) Obese diabetic mouse environment differentially affects primitive and monocytic endothelial cell progenitors. *Stem Cells.* 23(4):575-583.
- Azadzoï KM. (2006) Vasculogenic erectile dysfunction: beyond the haemodynamic changes. *BJU Int.* 97(1):11-16.
- Azadzoï KM, Kim N, Brown ML, Goldstein I, Cohen RA, Saenz de Tejada I. (1992) Endothelium-derived nitric oxide and cyclooxygenase products modulate corpus cavernosum smooth muscle tone. *J Urol.* 147(1):220-225.
- Bacon CG, Mittleman MA, Kawachi I, Giovannucci E, Glasser DB, Rimm EB. (2003) Sexual function in men older than 50 years of age: results from the health professionals follow-up study. *Ann Intern Med.* 139(3):161-168.
- Bakker W, Sipkema P, Stehouwer CD, Serne EH, Smulders YM, van Hinsbergh VW, Eringa EC. (2008) Protein kinase C  $\theta$  activation induces insulin-mediated constriction of muscle resistance arteries. *Diabetes.* 57:706-713.
- Ball LE, Berkaw MN, Buse MG. (2006) Identification of the major site of O-linked beta-N-acetylglucosamine modification in the C terminus of insulin receptor substrate-1. *Mol Cell Proteomics.* 5:313-323.
- Balletshofer BM, Rittig K, Enderle MD, Volk A, Maerker E, Jacob S, Matthaei S, Rett K, Häring HU. (2000) Endothelial dysfunction is detectable in young normotensive first-degree relatives of subjects with type 2 diabetes in association with insulin resistance. *Circulation.* 101(15):1780-1784.
- Bansal TC, Guay AT, Jacobson J, Woods BO, Nesto RW. (2005) Incidence of metabolic syndrome and insulin resistance in a population with organic erectile dysfunction. *J Sex Med.* 2(1):96-103.
- Baron AD, Brechtel G. (1993) Insulin differentially regulates systemic and skeletal muscle vascular resistance. *Am J Physiol.* 265(1 Pt 1):E61-67.
- Baron AD, Laakso M, Brechtel G, Edelman SV. (1991) Mechanism of insulin resistance in insulin-dependent diabetes mellitus: a major role for reduced skeletal muscle blood flow. *J Clin Endocrinol Metab.* 73(3):637-643.
- Baron AD, Zhu JS, Zhu JH, Weldon H, Maianu L, Garvey WT. (1995) Glucosamine induces insulin resistance in vivo by affecting GLUT 4 translocation in skeletal muscle. Implications for glucose toxicity. *J Clin Invest.* 96(6):2792-2801.
- Barton M, Traupe T, Haudenschild CC. (2003) Endothelin, hypercholesterolemia and atherosclerosis. *Coron Artery Dis.* 14(7):477-490.
- Bashan N, Kovsky J, Kachko I, Ovadia H, Rudich A. (2009) Positive and negative regulation of insulin signaling by reactive oxygen and nitrogen species. *Physiol Rev.* 89(1):27-71.
- Basson R, Schultz WW. (2007) Sexual sequelae of general medical disorders. *Lancet.* 369(9559):409-424.

- Batra AK, Lue TF. (1991) Penile erection: Circulatory physiology. Impotence: Diagnosis and management of male erectile dysfunction. EDs. Kirby, R. S., Carson, C. y Webster Oxford, G. D. Butterworth-Heinemann, U. K.
- Battisti WP, Palmisano J, Keane WE. (2003) Dyslipidemia in patients with type 2 diabetes. relationships between lipids, kidney disease and cardiovascular disease. *Clin Chem Lab Med*. 41(9):1174-1181.
- Bauer M, Wilkens H, Langer F, Schneider SO, Lausberg H, Schäfers HJ. (2002) Selective upregulation of endothelin B receptor gene expression in severe pulmonary hypertension. *Circulation*. 105(9):1034-1036.
- Becker AJ, Uckert S, Stief CG, Truss MC, Machtens S, Scheller F, Knapp WH, Hartmann U, Jonas U. (2001) Possible role of bradykinin and angiotensin II in the regulation of penile erection and detumescence. *Urology*. 57(1):193-198.
- Begum N, Duddy N, Sandu O, Reinzie J, Ragolia L. (2000) Regulation of myosin-bound protein phosphatase by insulin in vascular smooth muscle cells: evaluation of the role of Rho kinase and phosphatidylinositol-3-kinase-dependent signaling pathways. *Mol Endocrinol*. 14:1365-1376.
- Begum N, Ragolia L, Rienzie J, McCarthy M, Duddy N. (1998) Regulation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 induction by insulin in vascular smooth muscle cells. Evaluation of the role of the nitric oxide signaling pathway and potential defects in hypertension. *J Biol Chem*. 273:25164-25170.
- Begum N, Sandu OA, Duddy N. (2002) Negative regulation of rho signaling by insulin and its impact on actin cytoskeleton organization in vascular smooth muscle cells: role of nitric oxide and cyclic guanosine monophosphate signaling pathways. *Diabetes*. 51(7):2256-2263.
- Behr-Roussel D, Chamiot-Clerc P, Bernabe J, Mevel K, Alexandre L, Safar ME, Giuliano F. (2003) Erectile dysfunction in spontaneously hypertensive rats: pathophysiological mechanisms. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 284(3):R682-688.
- Belfort R, Mandarino L, Kashyap S, Wirfel K, Pratipanawatr T, Berria R, DeFronzo RA, Cusi K. (2005) Dose-response effect of elevated plasma free fatty acid on insulin signaling. *Diabetes*. 54:1640-1648.
- Bell DS. (1994) Stroke in the diabetic patient. *Diabetes Care*. 17(3):213-219.
- Bender SB, Klabunde RE. (2007) Altered role of smooth muscle endothelin receptors in coronary endothelin-1 and alpha1-adrenoceptor-mediated vasoconstriction in Type 2 diabetes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 293(4):H2281-2288.
- Berg AH, Scherer PE. (2005) Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circ Res*. 96(9):939-949.
- Bergandi L, Silvagno F, Russo I, Riganti C, Anfossi G, Aldieri E, Ghigo D, Trovati M, Bosia A. (2003) Insulin stimulates glucose transport via nitric oxide/cyclic GMP pathway in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 23:2215-2221.
- Berne y Levy (2006) Fisiología. Elsevier, 6ª Edición.
- Berweck S, Thieme H, Lepple-Wienhues A, Helbig H, Wiederholt M. (1993) Insulin-induced hyperpolarization in retinal capillary pericytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 34(12):3402-3407.
- Billups KL, Bank AJ, Padma-Nathan H, Katz S, Williams R. (2005) Erectile dysfunction is a marker for cardiovascular disease: results of the minority health institute expert advisory panel. *J Sex Med*. 2(1):40-52.



- Billups KL. (2005) Erectile dysfunction as an early sign of cardiovascular disease. *Int J Impot Res.* 17 Suppl 1:S19-24.
- Bivalacqua TJ, Champion HC, Usta MF, Celtek S, Chitaley K, Webb RC, Lewis RL, Mills TM, Hellstrom WJ, Kadowitz PJ. (2004) RhoA/Rho-kinase suppresses endothelial nitric oxide synthase in the penis: a mechanism for diabetes-associated erectile dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(24):9121-9126.
- Bivalacqua TJ, Usta MF, Kendirli M, Pradhan L, Alvarez X, Champion HC, Kadowitz PJ, Hellstrom WJ. (2005) Superoxide anion production in the rat penis impairs erectile function in diabetes: influence of in vivo extracellular superoxide dismutase gene therapy. *J Sex Med.* 2(2):187-198.
- Blumentals WA, Gomez-Caminero A, Joo S, Vannappagari V. (2004) Should erectile dysfunction be considered as a marker for acute myocardial infarction? Results from a retrospective cohort study. *Int J Impot Res.* 16(4):350-353.
- Boden G, She P, Mozzoli M, Cheung P, Gumireddy K, Reddy P, Xiang X, Luo Z, Ruderman N. (2005) Free fatty acids produce insulin resistance and activate the proinflammatory nuclear factor-kappaB pathway in rat liver. *Diabetes.* 54:3458-3465.
- Bogdan C. (2001) Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol.* 2(10):907-916.
- Böhm F, Pernow J. (2007) The importance of endothelin-1 for vascular dysfunction in cardiovascular disease. *Cardiovasc Res.* 76(1):8-18.
- Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A. (2003) Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23(2):168-175.
- Bonow RO, Smaha LA, Smith Jr SC, Mensah GA, L'enfant C. (2004) The international burden of cardiovascular disease: responding to the emerging global epidemic (Special Report, World Heart Day 2004). *Circulation.* 106(3):602-606.
- Bowles DK, Heaps CL, Turk JR, Maddali KK, Price EM. (2004) Hypercholesterolemia inhibits L-type calcium current in coronary macro-, not microcirculation. *J Appl Physiol.* 96(6):2240-2248.
- Bredt DS, Snyder SH. (1990) Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87(2):682-685.
- Brownlee M. (2001) Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature.* 414(6865):813-820.
- Brownlee M. (2005) The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes.* 54(6):1615-1625.
- Brozovich FV. (2003) Rho signaling: agonist stimulation and depolarization come together. *Circ Res.* 93(6):481-483
- Bryan RM Jr, You J, Golding EM, Marrelli SP. (2005) Endothelium-derived hyperpolarizing factor: a cousin to nitric oxide and prostacyclin. *Anesthesiology.* 102(6):1261-1277.
- Burchardt M, Burchardt T, Baer L, Kiss AJ, Pawar RV, Shabsigh A, de la Taille A, Hayek OR, Shabsigh R. (2000) Hypertension is associated with severe erectile dysfunction. *J Urol.* 164(4):1188-1191.
- Burnett AL. (1995) Nitric oxide control of lower genitourinary tract functions: a review. *Urology.* 45(6):1071-83.
- Burnett AL. (1998) *The Handbook of Sexual Dysfunction.* San Francisco: Am. Soc. Androl.

- Burnett AL. (2004) Novel nitric oxide signaling mechanisms regulate the erectile response. *Int J Impot Res.* 16 Suppl 1:S15-9.
- Burnett AL, Lowenstein CJ, Bredt DS, Chang TS, Snyder SH. (1992) Nitric oxide: a physiologic mediator of penile erection. *Science.* 257(5068):401-403.
- Buse MG. (2006) Hexosamines, insulin resistance, and the complications of diabetes: current status. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 290(1):E1-E8.
- Buus NH, Bøttcher M, Hermansen F, Sander M, Nielsen TT, Mulvany MJ. (2001) Influence of nitric oxide synthase and adrenergic inhibition on adenosine-induced myocardial hyperemia. *Circulation.* 104(19):2305-2310.
- Caballero AE, Arora S, Saouaf R, Lim SC, Smakowski P, Park JY, King GL, LoGerfo FW, Horton ES, Veves A. (1999) Microvascular and macrovascular reactivity is reduced in subjects at risk for type 2 diabetes. *Diabetes.* 48(9):1856-1862.
- Camici PG, Crea F. (2007) Coronary microvascular dysfunction. *N Engl J Med.* 356(8):830-840.
- Camici PG. (2000) Positron emission tomography and myocardial imaging. *Heart.* 82:475-480.
- Cannon RO, Camici PG, Epstein SE. (1992) Pathophysiological dilemma of syndrome X. *Circulation.* 85(3):883-892.
- Cantley LC. (2002) The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science.* 296:1655-1657.
- Cardillo C, Nambi SS, Kilcoyne CM, Choucair WK, Katz A, Quon MJ, Panza JA. (1999) Insulin stimulates both endothelin and nitric oxide activity in the human forearm. *Circulation.* 100(8):820-825.
- Cardillo C, Schinzari F, Melina D, Mores N, Bosello S, Peluso G, Zoli A, Ferraccioli G. (2009) Improved endothelial function after endothelin receptor blockade in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 60(6):1840-1844.
- Carneiro FS, Nunes KP, Giachini FR, Lima VV, Carneiro ZN, Nogueira EF, Leite R, Ergul A, Rainey WE, Clinton Webb R, Tostes RC. (2008) Activation of the ET-1/ET<sub>A</sub> pathway contributes to erectile dysfunction associated with mineralocorticoid hypertension. *J Sex Med.* 5(12):2793-2807.
- Caro JF, Sinha MK, Raju SM, Ittoop O, Pories WJ, Flickinger EG, Meelheim D, Dohm GL. (1987) Insulin receptor kinase in human skeletal muscle from obese subjects with and without noninsulin dependent diabetes. *J Clin Invest.* 79:1330-1337.
- Center for Health Statistics, Dept. of Health (2003) Fast Statistics Report. National Centers for Disease Control and Prevention. September USA.
- Cersosimo E, DeFronzo RA. (2006) Insulin resistance and endothelial dysfunction: the road map to cardiovascular diseases. *Diabetes Metab Res Rev.* 22(6):423-436.
- Champion HC, Bivalacqua TJ, Hyman AL, Ignarro LJ, Hellstrom WJ, Kadowitz PJ. (1999) Gene transfer of endothelial nitric oxide synthase to the penis augments erectile responses in the aged rat. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(20):11648-11652.
- Chang S, Hypolite JA, Changolkar A, Wein AJ, Chacko S, DiSanto ME. (2003) Increased contractility of diabetic rabbit corpora smooth muscle in response to endothelin is mediated via Rho-kinase beta. *Int J Impot Res.* 15(1):53-62.
- Chavakis T, Bierhaus A, Nawroth PP. (2004) RAGE (receptor for advanced glycation end products): a central player in the inflammatory response. *Microbes Infect.* 6(13):1219-1225.

- Chavez JA, Knotts TA, Wang LP, Li G, Dobrowsky RT, Florant GL, Summers SA. (2003) A role for ceramide, but not diacylglycerol, in the antagonism of insulin signal transduction by saturated fatty acids. *J Biol Chem.* 278(12):10297-10303.
- Cheatham B, Kahn CR. (1995) Insulin action and the insulin signaling network. *Endocr Rev.* 16:117-142.
- Cheitlin MD. (2004) Erectile dysfunction: the earliest sign of generalized vascular disease? *J Am Coll Cardiol.* 43(2):185-186.
- Chew KK, Bremner A, Jamrozik K, Earle C, Stuckey B. (2008) Male erectile dysfunction and cardiovascular disease: is there an intimate nexus? *J Sex Med.* 5(4):928-934.
- Chiariello M, Indolfi C. (1996) Silent myocardial ischemia in patients with diabetes mellitus. *Circulation.* 93(12):2089-91.
- Chilian WM. (1997) Coronary microcirculation in health and disease. Summary of an NHLBI workshop. *Circulation.* 95(2):522-528.
- Chisalita SI, Arnqvist HJ. (2004) Insulin-like growth factor I receptors are more abundant than insulin receptors in human micro- and macrovascular endothelial cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 286(6):E896-901.
- Chitale K, Wingard CJ, Clinton Webb R, Branam H, Stopper VS, Lewis RW, Mills TM. (2001) Antagonism of Rho-kinase stimulates rat penile erection via a nitric oxide-independent pathway. *Nat Med.* 7(1):119-122.
- Chiurlia E, D'Amico R, Ratti C, Granata AR, Romagnoli R, Modena MG. (2005) Subclinical coronary artery atherosclerosis in patients with erectile dysfunction. *J Am Coll Cardiol.* 46(8):1503-1506.
- Chou CK, Dull TJ, Russell DS, Gherzi R, Lebowitz D, Ullrich A, Rosen OM. (1987) Human insulin receptors mutated at the ATP-binding site lack protein tyrosine kinase activity and fail to mediate postreceptor effects of insulin. *J Biol Chem.* 262(4):1842-1847.
- Chung WS, Sohn JH, Park YY. (1999) Is obesity an underlying factor in erectile dysfunction? *Eur Urol.* 36(1):68-70.
- Clark MG. (2008) Impaired microvascular perfusion: a consequence of vascular dysfunction and a potential cause of insulin resistance in muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 295(4):E732-750.
- Clark MG, Wallis MG, Barrett EJ, Vincent MA, Richards SM, Clerk LH, Rattigan S. (2003) Blood flow and muscle metabolism: a focus on insulin action. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 284(2):E241-258.
- Cohn PF. (2005) Silent myocardial ischemia: recent developments. *Curr Atheroscler Rep.* 7(2):155-163.
- Colucciello M. (2004) Diabetic retinopathy. Control of systemic factors preserves vision. *Postgrad Med.* 116(1):57-64.
- Comiter CV, Sullivan MP, Yalla SV, Kifor I. (1997) Effect of angiotensin II on corpus cavernosum smooth muscle in relation to nitric oxide environment: in vitro studies in canines. *Int J Impot Res.* 9(3):135-140.
- Conti M, Renaud IM, Poirier B, Michel O, Belair MF, Mandet C, Bruneval P, Myara I, Chevalier J. (2004) High levels of myocardial antioxidant defense in aging nondiabetic normotensive Zucker obese rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 286:R793-800.

- Contreras C, Sánchez A, Martínez P, Raposo R, Climent B, García-Sacristán A, Benedito S, Prieto D. (2010) Insulin resistance in penile arteries from a rat model of metabolic syndrome. *Br J Pharmacol*. 161:350-364.
- Contreras C, Sánchez A, García-Sacristán A, Martínez MC, Andriantsitohaina R, Prieto D. (2011) Preserved insulin vasorelaxation and up-regulation of the Akt/eNOS pathway in coronary arteries from insulin resistant Obese Zucker rats. *Arteriosclerosis*. En prensa.
- Cooper's. (2002) *La célula*. Editorial Marbán 2ª edición.
- Cosentino F, Lscher TF. (1999) Tetrahydrobiopterin and endothelial nitric oxide synthase activity. *Cardiovasc Res*. 43(2):274-278.
- Cosentino F, Patton S, d'Uscio LV, Werner ER, Werner-Felmayer G, Moreau P, Malinski T, Lscher TF. (1998) Tetrahydrobiopterin alters superoxide and nitric oxide release in prehypertensive rats. *J Clin Invest*. 101(7):1530-1537.
- Costa C, Virag R. (2009) The endothelial-erectile dysfunction connection: an essential update. *J Sex Med*. 6(9):2390-2404.
- Cotran RS, Kumar V, Collins T. (1999). *Robbins pathologic basis of disease*. WA Saunders 6ª edición.
- Creager MA, Liang CS, Coffman JD. (1985) Beta adrenergic-mediated vasodilator response to insulin in the human forearm. *J Pharmacol Exp Ther*. 235(3):709-714.
- Creager MA, Lscher TF, Cosentino F, Beckman JA. (2003) Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: Part I. *Circulation*. 108(12):1527-1532.
- Cubbon RM, Rajwani A, Wheatcroft SB. (2007) The impact of insulin resistance on endothelial function, progenitor cells and repair. *Diab Vasc Dis Res*. 4(2):103-111.
- Cusi K, Maezono K, Osman A, Pendergrass M, Patti ME, Pratipanawatr T, DeFronzo RA, Kahn CR, Mandarino LJ. (2000) Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle. *J Clin Invest*. 105(3):311-320.
- Dai Y, Pollock DM, Lewis RL, Wingard CJ, Stopper VS, Mills TM. (2000) Receptor-specific influence of endothelin-1 in the erectile response of the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 279(1):R25-30.
- Daley JT, Brown ML, Watkins T, Traish AM, Huang YH, Moreland RB, De Tejada IS. (1996) Prostanoid production in rabbit corpus cavernosum: I. regulation by oxygen tension. *J Urol*. 155(4):1482-1487.
- Dallas. (2003) American Heart Association. Heart Disease and Stroke Statistics. American Heart Association.
- D'Angelo G, Mintz JD, Tidwell JE, Schreihöfer AM, Pollock DM, Stepp DW. (2006) Exaggerated cardiovascular stress responses and impaired beta-adrenergic-mediated pressor recovery in obese Zucker rats. *Hypertension*. 48(6):1109-1115.
- Davies M. (2000) Stability and instability: two faces of coronary atherosclerosis. *Circulation*. 94:2013-2020.
- Dawson D, Vincent MA, Barrett EJ, Clark MG, Leong-Poi H, Lindner JR. (2002) Vascular recruitment in skeletal muscle during exercise and hyperinsulinemia assessed by contrast ultrasound. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 282:E714-E720.

- De Alvaro C, Teruel T, Hernandez R, Lorenzo M. (2004) Tumor necrosis factor alpha produces insulin resistance in skeletal muscle by activation of inhibitor kappaB kinase in a p38 MAPK-dependent manner. *J Biol Chem.* 279(17):17070-17078.
- De Caterina R, Libby P, Peng HB, Thannickal VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone MA Jr, Shin WS, Liao JK. (1995) Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest.* 96(1):60-68.
- De Groat WC, Booth AM. (1993) Neural control of penile erection, in *The Autonomic Nervous System, Nervous Control of the Urogenital System*. Harwood Academic Publishers. 6:465-513.
- De Meyer GR, Herman AG. (1997) Vascular endothelial dysfunction. *Prog Cardiovasc Dis.* 39(4):325-342.
- De Nucci G, Thomas R, D'Orleans-Juste P, Antunes E, Walder C, Warner TD, Vane JR. (1988) Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85(24):9797-9800.
- Debin R, Lauzier B, Sicard P, Delemasure S, Amoureux S, Duvillard L, Vergely C, Cottin Y, Rochette L. (2009) Are Zucker obese rats a useful model for cardiovascular complications in metabolic syndrome? Physical, biochemical and oxidative stress considerations. *Fundam Clin Pharmacol.* 23:59-67.
- DeFronzo RA, Ferrannini E. (1991) Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care.* 14(3):173-194.
- DeFronzo RA. (2010) Insulin resistance, lipotoxicity, type 2 diabetes and atherosclerosis: the missing links. The Claude Bernard Lecture 2009. *Diabetologia.* 53(7):1270-1287.
- Demir T, Demir O, Kefi A, Comlekci A, Yesil S, Esen A. (2006) Prevalence of erectile dysfunction in patients with metabolic syndrome. *Int J Urol.* 13(4):385-388.
- Desouza C, Parulkar A, Lumpkin D, Akers D, Fonseca VA. (2002) Acute and prolonged effects of sildenafil on brachial artery flow-mediated dilatation in type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 25(8):1336-1339.
- Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. (1999) Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature.* 399(6736):601-605.
- Dong F, Zhang X, Wold LE, Ren Q, Zhang Z, Ren J. (2005) Endothelin-1 enhances oxidative stress, cell proliferation and reduces apoptosis in human umbilical vein endothelial cells: role of ETB receptor, NADPH oxidase and caveolin-1. *Br J Pharmacol.* 145(3):323-333.
- Dresner A, Laurent D, Marcucci M, Griffin ME, Dufour S, Cline GW, Slezak LA, Andersen DK, Hundal RS, Rothman DL, Petersen KF, Shulman GI. (1999) Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J Clin Invest.* 103:253-259.
- Du X, Edelstein D, Obici S, Higham N, Zou MH, Brownlee M. (2006) Insulin resistance reduces arterial prostacyclin synthase and eNOS activities by increasing endothelial fatty acid oxidation. *J Clin Invest.* 116(4):1071-1080.
- Du XL, Edelstein D, Dimmeler S, Ju Q, Sui C, Brownlee M. (2001) Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site. *J Clin Invest.* 108(9):1341-1348.

- Du XL, Edelstein D, Rossetti L, Fantus IG, Goldberg H, Ziyadeh F, Wu J, Brownlee M. (2000) Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97(22):12222-12226.
- Duncan ER, Crossey PA, Walker S, Anilkumar N, Poston L, Douglas G, Ezzat VA, Wheatcroft SB, Shah AM, Kearney MT. (2008) Effect of endothelium-specific insulin resistance on endothelial function in vivo. *Diabetes*. 57(12):3307-3314.
- Ehrenreich H, Anderson RW, Fox CH, Rieckmann P, Hoffman GS, Travis WD, Coligan JE, Kehrl JH, Fauci AS. (1990) Endothelins, peptides with potent vasoactive properties, are produced by human macrophages. *J Exp Med*. 172(6):1741-1748.
- Endemann DH, Schiffrin EL. (2004) Endothelial dysfunction. *J Am Soc Nephrol*. 15(8):1983-92.
- Ergul A, Johansen JS, Strømhaug C, Harris AK, Hutchinson J, Tawfik A, Rahimi A, Rhim E, Wells B, Caldwell RW, Anstadt MP. (2005) Vascular dysfunction of venous bypass conduits is mediated by reactive oxygen species in diabetes: role of endothelin-1. *J Pharmacol Exp Ther*. 313(1):70-77.
- Eringa EC, Stehouwer CD, Merlijn T, Westerhof N, Sipkema P. (2002) Physiological concentrations of insulin induce endothelin-mediated vasoconstriction during inhibition of NOS or PI3-kinase in skeletal muscle arterioles. *Cardiovasc Res*. 56:464-471.
- Eringa EC, Stehouwer CD, van Nieuw Amerongen GP, Ouwehand L, Westerhof N, Sipkema P. (2004) Vasoconstrictor effects of insulin in skeletal muscle arterioles are mediated by ERK1/2 activation in endothelium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 287(5):H2043-2048.
- Eringa ED, Stehouwer CD, Roos MH, Westerhof N, Sipkema P. (2007) Selective resistance to vasoactive effects of insulin in muscle resistance arteries of obese Zucker (fa/fa) rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 293:E1134-E1139.
- Escribano O, Guillén C, Nevado C, Gómez-Hernández A, Kahn CR, Benito M. (2009) Beta-Cell hyperplasia induced by hepatic insulin resistance: role of a liver-pancreas endocrine axis through insulin receptor A isoform. *Diabetes*. 58(4):820-828.
- Escrig A, Marin R, Abreu P, Gonzalez-Mora JL, Mas M. (2002) Changes in mating behavior, erectile function, and nitric oxide levels in penile corpora cavernosa in streptozotocin-diabetic rats. *Biol Reprod*. 66(1):185-189.
- Esposito K, Giugliano F, Ciotola M, De Sio M, D'Armiento M, Giugliano D. (2008) Obesity and sexual dysfunction, male and female. *Int J Impot Res*. 20(4):358-365.
- Esposito K, Giugliano F, De Sio M, Carleo D, Di Palo C, D'Armiento M, Giugliano D. (2006) Dietary factors in erectile dysfunction. *Int J Impot Res*. 18(4):370-374.
- Esposito K, Giugliano F, Martedì E, Feola G, Marfella R, D'Armiento M, Giugliano D. (2005) High proportions of erectile dysfunction in men with the metabolic syndrome. *Diabetes Care*. 28(5):1201-1203.
- Esposito K, Nappo F, Marfella R, Giugliano G, Giugliano F, Ciotola M, Quagliaro L, Ceriello A, Giugliano D. (2002) Inflammatory cytokine concentrations are acutely increased by hyperglycemia in humans: role of oxidative stress. *Circulation*. 106(16):2067-2072.
- Esposito K, Pontillo A, Di Palo C, Giugliano G, Masella M, Marfella R, Giugliano D. (2003) Effect of weight loss and lifestyle changes on vascular inflammatory markers in obese women: a randomized trial. *JAMA*. 289(14):1799-1704.

- Fadini GP, de Kreutzenberg SV, Coracina A, Baesso I, Agostini C, Tiengo A, Avogaro A. (2006) Circulating CD34+ cells, metabolic syndrome, and cardiovascular risk. *Eur Heart J.* 27(18):2247-2255.
- Federici M, Menghini R, Mauriello A, Hribal ML, Ferrelli F, Lauro D, Sbraccia P, Spagnoli LG, Sesti G, Lauro R. (2002) Insulin-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase is impaired by O-linked glycosylation modification of signaling proteins in human coronary endothelial cells. *Circulation.* 106:466-472.
- Federici M, Pandolfi A, De Filippis EA, Pellegrini G, Menghini R, Lauro D, Cardellini M, Romano M, Sesti G, Lauro R, Consoli A. (2004) G972R IRS-1 variant impairs insulin regulation of endothelial nitric oxide synthase in cultured human endothelial cells. *Circulation.* 109(3):399-405.
- Feldman HA, Goldstein I, Hatzichristou DG, Krane RJ, McKinlay JB. (1994) Impotence and its medical and psychosocial correlates: results of the Massachusetts Male Aging Study. *J Urol.* 151(1):54-61.
- Feldman HA, Johannes CB, Derby CA, Kleinman KP, Mohr BA, Araujo AB, McKinlay JB. (2000) Erectile dysfunction and coronary risk factors: prospective results from the Massachusetts male aging study. *Prev Med.* 30(4):328-338.
- Féltou M, Vanhoutte PM. (2006) Endothelium-derived hyperpolarizing factor: where are we now? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 26(6):1215-1225.
- Fellner SK, Arendshorst WJ. (2002) Store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry is exaggerated in fresh preglomerular vascular smooth muscle cells of SHR. *Kidney Int.* 61(6):2132-2141.
- Ferrara N, Abete P, Ambrosio G, Landino P, Caccese P, Cirillo P, Oradei A, Littarru GP, Chiariello M, Rengo F. (1995) Protective role of chronic ubiquinone administration on acute cardiac oxidative stress. *J Pharmacol Exp Ther.* 274(2):858-865.
- Ferro A, Coash M, Yamamoto T, Rob J, Ji Y, Queen L. (2004) Nitric oxide-dependent beta2-adrenergic dilatation of rat aorta is mediated through activation of both protein kinase A and Akt. *Br J Pharmacol.* 143(3):397-403.
- Fleming I, Busse R. (2003) Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 284(1):R1-12.
- Fleming I, Fisslthaler B, Dimmeler S, Kemp BE, Busse R. (2001) Phosphorylation of Thr(495) regulates  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity. *Circ Res.* 88(11):E68-75.
- Flemming R, Cheong A, Dedman AM, Beech DJ. (2002) Discrete store-operated calcium influx into an intracellular compartment in rabbit arteriolar smooth muscle. *J Physiol.* 543(Pt 2):455-464.
- Flemming R, Xu SZ, Beech DJ. (2003) Pharmacological profile of store-operated channels in cerebral arteriolar smooth muscle cells. *Br J Pharmacol.* 139(5):955-965.
- Fonseca V, Jawa A. (2005) Endothelial and erectile dysfunction, diabetes mellitus, and the metabolic syndrome: common pathways and treatments?. *Am J Cardiol.* 96(12B):13M-18M.
- Frank HJ, Levin ER, Hu RM, Pedram A. (1993) Insulin stimulates endothelin binding and action on cultured vascular smooth muscle cells. *Endocrinology.* 133(3):1092-1097.
- Fulop T, Jebelovszki E, Erdei N, Szerafin T, Forster T, Edes I, Koller A, Bagi Z. (2007) Adaptation of vasomotor function of human coronary arterioles to the simultaneous presence of obesity and hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 27(11):2348-2354.

- Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, Franke TF, Papapetropoulos A, Sessa WC. (1999) Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature*. 399(6736):597-601.
- Fulton D, Harris MB, Kemp BE, Venema RC, Marrero MB, Stepp DW. (2004) Insulin resistance does not diminish eNOS expression, phosphorylation, or binding to HSP-90. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 287(6):H2384-2393.
- Fung MM, Bettencourt R, Barrett-Connor E. (2004) Heart disease risk factors predict erectile dysfunction 25 years later: the Rancho Bernardo Study. *J Am Coll Cardiol*. 43(8):1405-1411.
- Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I. (2004) Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest*. 114(12):1752-1761.
- Galle J, Lehmann-Bodem C, Hbner U, Heinloth A, Wanner C. (2000) CyA and OxLDL cause endothelial dysfunction in isolated arteries through endothelin-mediated stimulation of O(2)(-) formation. *Nephrol Dial Transplant*. 15(3):339-346.
- Ganz MB, Seftel A. (2000) Glucose-induced changes in protein kinase C and nitric oxide are prevented by vitamin E. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 278(1):E146-152.
- Ganz P, Ganz W. (2001) Coronary blood flow and myocardial ischemia. WB Saunders. 6ª edición.
- Gao F, Gao E, Yue TL, Ohlstein EH, Lopez BL, Christopher TA, Ma XL. (2002) Nitric oxide mediates the antiapoptotic effect of insulin in myocardial ischemia-reperfusion: the roles of PI3-kinase, Akt, and endothelial nitric oxide synthase phosphorylation. *Circulation*. 105(12):1497-1502.
- Gao Z, Hwang D, Bataille F, Lefevre M, York D, Quon MJ, Ye J. (2002) Serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by inhibitor kappa B kinase complex. *J Biol Chem*. 277(50):48115-48121.
- Gazzaruso C, Giordanetti S, De Amici E, Bertone G, Falcone C, Geroldi D, Fratino P, Solerte SB, Garzaniti A. (2004) Relationship between erectile dysfunction and silent myocardial ischemia in apparently uncomplicated type 2 diabetic patients. *Circulation*. 110(1):22-26.
- Gibbons G. (2000) Endothelial function as a determinant of vascular function and structure: a new therapeutic target. *And J cardiol*. 79(5a):3-8.
- Gibbons GH, Dzau VJ. (1994) The emerging concept of vascular remodeling. *N Engl J Med*. 330:1431-1438.
- Gimbrone MA Jr. (1995) Vascular endothelium: an integrator of pathophysiologic stimuli in atherosclerosis. *Am J Cardiol*. 75(6):67B-70B.
- Giuliano F, Bernabe J, Jardin A, Rousseau JP. (1993) Antierectile role of the sympathetic nervous system in rats. *J Urol*. 150(2 Pt 1):519-24.
- Giuliano FA, Leriche A, Jaudinot EO, de Gendre AS. (2004) Prevalence of erectile dysfunction among 7689 patients with diabetes or hypertension, or both. *Urology*. 64(6):1196-1201.
- Goldstein AM, Padma-Nathan H. (1990) The microarchitecture of the intracavernosal smooth muscle and the cavernosal fibrous skeleton. *J Urol*. 144(5):1144-6.
- Goligorsky MS, Tsukahara H, Magazine H, Andersen TT, Malik AB, Bahou WF. (1994) Termination of endothelin signaling: role of nitric oxide. *J Cell Physiol*. 158(3):485-494.



- Golovina VA. (1999) Cell proliferation is associated with enhanced capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  entry in human arterial myocytes. *Am J Physiol.* 277(2 Pt 1):C343-349.
- Gomez-Hernandez A, de Las Heras N, Otero YF, Escribano O, Gozalbo-Lopez B, Guillen C, Cachafeiro V, Lahera V, Benito M. (2011) Differential vascular damage in non-compensated versus compensated insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* En prensa.
- Grassi G. (2003) Diabetic retinopathy. *Minerva Med.* 94(6):419-435.
- Grisk O, Frauendorf T, Schlüter T, Klötting I, Kuttler B, Krebs A, Lüdemann J, Rettig R. (2007) Impaired coronary function in Wistar Ottawa Karlsburg W rats-a new model of the metabolic syndrome. *Pflugers Arch.* 454(6):1011-1021.
- Gryniewicz G, Poenie M, Tsien RY. (1985) A new generation of  $\text{Ca}^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem.* 260(6):3440-3450.
- Gür S, Oztrk B, Karahan ST. (2000) Impaired endothelium-dependent and neurogenic relaxation of corpus cavernosum from diabetic rats: improvement with L-arginine. *Urol Res.* 28(1):14-19.
- Gustafson TA, He W, Craparo A, Schaub CD, O'Neill TJ. (1995) Phosphotyrosine-dependent interaction of SHC and insulin receptor substrate 1 with the NPEY motif of the insulin receptor via a novel non-SH2 domain. *Mol Cell Biol.* 15:2500-2508.
- Guyton A, Hall JE. (2006) Tratado de fisiología médica. WB Saunders 11ª edición.
- Guzik TJ, Mussa S, Gastaldi D, Sadowski J, Ratnatunga C, Pillai R, Channon KM. (2002) Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase. *Circulation.* 105(14):1656-1662.
- Guzmán-Ruiz R, Somoza B, Gil-Ortega M, Merino B, Cano V, Attané C, Castan-Laurell I, Valet P, Fernández-Alfonso MS, Ruiz-Gayo M. (2010) Sensitivity of cardiac carnitine palmitoyltransferase to malonyl-CoA is regulated by leptin: similarities with a model of endogenous hyperleptinemia. *Endocrinology.* 151:1010-1018.
- Habbu A, Lakkis NM, Dokainish H. (2006) The obesity paradox: fact or fiction? *Am J Cardiol.* 98(7):944-948.
- Haber CA, Lam TK, Yu Z, Gupta N, Goh T, Bogdanovic E, Giacca A, Fantus IG. (2003) N-acetylcysteine and taurine prevent hyperglycemia-induced insulin resistance in vivo: possible role of oxidative stress. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 285:E744-753.
- Hakim LS, Goldstein I. (1996) Diabetic sexual dysfunction. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 25(2):379-400.
- Hall JA, French TK, Rasmusson KD, Vesty JC, Roberts CA, Rimmasch HL, Kfoury AG, Renlund DG. (2005) The paradox of obesity in patients with heart failure. *J Am Acad Nurse Pract.* 17(12):542-546.
- Harris AK, Elgebaly MM, Li W, Sachidanandam K, Ergul A. (2008) Effect of chronic endothelin receptor antagonism on cerebrovascular function in type 2 diabetes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 294(4):R1213-1219.
- Harris AK, Hutchinson JR, Sachidanandam K, Johnson MH, Dorrance AM, Stepp DW, Fagan SC, Ergul A. (2005) Type 2 diabetes causes remodeling of cerebrovasculature via differential regulation of matrix metalloproteinases and collagen synthesis: role of endothelin-1. *Diabetes.* 54(9):2638-2644.
- Harris RD, Steffes MW, Bilous RW, Sutherland DE, Mauer SM. (1991) Global glomerular sclerosis and glomerular arteriolar hyalinosis in insulin dependent diabetes. *Kidney Int.* 40(1):107-114.

- Hartell NA, Archer HE, Bailey CJ. (2005) Insulin-stimulated endothelial nitric oxide release is calcium independent and mediated via protein kinase B. *Biochem Pharmacol.* 69(5):781-790.
- Hasdai D, Rizza RA, Holmes DR Jr, Richardson DM, Cohen P, Lerman A. (1998) Insulin and insulin-like growth factor-I cause coronary vasorelaxation in vitro. *Hypertension.* 32(2):228-234.
- Hashimoto M, Akishita M, Eto M, Kozaki K, Ako J, Sugimoto N, Yoshizumi M, Toba K, Ouchi Y. (1998) The impairment of flow-mediated vasodilatation in obese men with visceral fat accumulation. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 22(5):477-484.
- Hattori T, Shimokawa H, Higashi M, Hiroki J, Mukai Y, Tsutsui H, Kaibuchi K, Takeshita A. (2004) Long-term inhibition of Rho-kinase suppresses left ventricular remodeling after myocardial infarction in mice. *Circulation.* 109(18):2234-2239.
- Heaton JP, Adams MA. (2004) Causes of erectile dysfunction. *Endocrine.* 23(2-3):119-123.
- Hedlund H, Andersson KE. (1985) Comparison of the responses to drugs acting on adrenoreceptors and muscarinic receptors in human isolated corpus cavernosum and cavernous artery. *J Auton Pharmacol.* 5(1):81-88.
- Hedlund P, Alm P, Andersson KE. (1999) NO synthase in cholinergic nerves and NO-induced relaxation in the rat isolated corpus cavernosum. *Br J Pharmacol.* 127(2):349-360.
- Hedlund P, Ny L, Alm P, Andersson KE. (2000) Cholinergic nerves in human corpus cavernosum and spongiosum contain nitric oxide synthase and heme oxygenase. *J Urol.* 164(3 Pt 1):868-875.
- Hellstrom WJ, Monga M, Wang R, domer FR, Kadowitz PJ, Roberts JA. (1994) Penile erection in the primate: induction with nitric-oxide donors. *J. Urol.* 151:1723-17.
- Henderson KK, Turk JR, Rush JW, Laughlin MH. (2004) Endothelial function in coronary arterioles from pigs with early-stage coronary disease induced by high-fat, high-cholesterol diet: effect of exercise. *J Appl Physiol.* 97(3):1159-1168.
- Hess OM, Bchi M, Kirkeeide R, Niederer P, Anliker M, Gould KL, Kräyenbühl HP. (1990) Potential role of coronary vasoconstriction in ischaemic heart disease: effect of exercise. *Eur Heart J.* 11 Suppl B:58-64.
- Higashi M, Shimokawa H, Hattori T, Hiroki J, Mukai Y, Morikawa K, Ichiki T, Takahashi S, Takeshita A. (2003) Long-term inhibition of Rho-kinase suppresses angiotensin II-induced cardiovascular hypertrophy in rats in vivo: effect on endothelial NAD(P)H oxidase system. *Circ Res.* 93(8):767-775.
- Himpens B, Casteels R. (1987) Measurement by Quin2 of changes of the intracellular calcium concentration in strips of the rabbit ear artery and of the guinea-pig ileum. *Pflugers Arch.* 408(1):32-37.
- Hink U, Li H, Mollnau H, Oelze M, Matheis E, Hartmann M, Skatchkov M, Thaïss F, Stahl RA, Warnholtz A, Meinertz T, Griendling K, Harrison DG, Forstermann U, Münzel T. (2001) Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ Res.* 88(2):E14-22.
- Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Görgn CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M, Hotamisligil GS. (2002) A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature.* 420(6913):333-336.
- Hofmann MA, Drury S, Fu C, Qu W, Taguchi A, Lu Y, Avila C, Kambham N, Bierhaus A, Nawroth P, Neurath MF, Slattey T, Beach D, McClary J, Nagashima M, Morser J, Stern D, Schmidt AM. (1999) RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell.* 97(7):889-901.

- Holmquist F, Andersson KE, Hedlund H. (1990) Actions of endothelin on isolated corpus cavernosum from rabbit and man. *Acta Physiol Scand.* 139(1):113-122.
- Holmquist F, Hedlund H, Andersson KE. (1992) Characterization of inhibitory neurotransmission in the isolated corpus cavernosum from rabbit and man. *J Physiol.* 449:295-311.
- Honing ML, Morrison PJ, Banga JD, Stroes ES, Rabelink TJ. (1998) Nitric oxide availability in diabetes mellitus. *Diabetes Metab Rev.* 14(3):241-249.
- Hopfner RL, Hasnadka RV, Wilson TW, McNeill JR, Gopalakrishnan V. (1998) Insulin increases endothelin-1-evoked intracellular free calcium responses by increased ET(A) receptor expression in rat aortic smooth muscle cells. *Diabetes.* 47(6):937-944.
- Hori S, Komatsu Y, Shigemoto R, Mizuno N, Nakanishi S. (1992) Distinct tissue distribution and cellular localization of two messenger ribonucleic acids encoding different subtypes of rat endothelin receptors. *Endocrinology.* 130(4):1885-1895.
- Horwich TB, Fonarow GC. (2002) The impact of obesity on survival in patients with heart failure. *Heart Fail Monit.* 3(1):8-14.
- Hoyert DL, Kochanek KD, Murphy SL. (1999) Deaths: final data for 1997. *Natl Vital Stat Rep.* 47(19):1-104.
- Hsu CY, Bates DW, Kuperman GJ, Curhan GC. (2000) Diabetes, hemoglobin A(1c), cholesterol, and the risk of moderate chronic renal insufficiency in an ambulatory population. *Am J Kidney Dis.* 36(2):272-281.
- Huang LC, Heimark D, Linko J, Nolan R, Larner J. (1999) A model phosphatase 2C --> phosphatase 1 activation cascade via dual control of inhibitor-1 (INH-1) and DARPP-32 dephosphorylation by two inositol glycan putative insulin mediators from beef liver. *Biochem Biophys Res Commun.* 255(1):150-156.
- Huijberts MS, Wolffenbuttel BH, Boudier HA, Crijns FR, Kruseman AC, Poitevin P, Lévy BI. (1993) Aminoguanidine treatment increases elasticity and decreases fluid filtration of large arteries from diabetic rats. *J Clin Invest.* 92(3):1407-1411.
- Hurt KJ, Musicki B, Palese MA, Crone JK, Becker RE, Moriarity JL, Snyder SH, Burnett AL. (2002) Akt-dependent phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase mediates penile erection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(6):4061-4066.
- Hwang J, Kleinhenz DJ, Rupnow HL, Campbell AG, Thulé PM, Sutliff RL, Hart CM. (2007) The PPARgamma ligand, rosiglitazone, reduces vascular oxidative stress and NADPH oxidase expression in diabetic mice. *Vascul Pharmacol.* 46(6):456-462.
- Igarashi J, Thatte HS, Prabhakar P, Golan DE, Michel T. (1999) Calcium-independent activation of endothelial nitric oxide synthase by ceramide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(22):12583-12588.
- Ignarro LJ. (1999) Nitric oxide: a unique endogenous signaling molecule in vascular biology. *Biosci Rep.* 19(2):51-71.
- Ikeda K, Wada Y, Sanematsu H, Foster HE Jr, Shin D, Weiss RM, Latifpour J. (2001) Regulatory effect of experimental diabetes on the expression of endothelin receptor subtypes and their gene transcripts in the rat adrenal gland. *J Endocrinol.* 168(1):163-175.
- Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, Imamura M, Aoki T, Etoh T, Hashimoto T, Naruse M, Sano H, Utsumi H, Nawata H. (2000) High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen

- species production through protein kinase C--dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes*. 49(11):1939-1945.
- Iozzo P, Chareonthaitawee P, Di Terlizzi M, Betteridge DJ, Ferrannini E, Camici PG. (2002a) Regional myocardial blood flow and glucose utilization during fasting and physiological hyperinsulinemia in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 282(5):E1163-1171.
- Iozzo P, Chareonthaitawee P, Rimoldi O, Betteridge DJ, Camici PG, Ferrannini E. (2002b) Mismatch between insulin-mediated glucose uptake and blood flow in the heart of patients with Type II diabetes. *Diabetologia*. 45:1404-1409.
- Itani SI, Ruderman NB, Schmieder F, Boden G. (2002) Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and I $\kappa$ B $\alpha$ . *Diabetes*. 51(7):2005-2011.
- Ito H, Hirata Y, Adachi S, Tanaka M, Tsujino M, Koike A, Nogami A, Murumo F, Hiroe M. (1993) Endothelin-1 is an autocrine/paracrine factor in the mechanism of angiotensin II-induced hypertrophy in cultured rat cardiomyocytes. *J Clin Invest*. 92(1):398-403.
- Jackson G, Montorsi P, Adams MA, Anis T, El-Sakka A, Miner M, Vlachopoulos C, Kim E. (2010) Cardiovascular aspects of sexual medicine. *J Sex Med*. 7(4 Pt 2):1608-1626.
- Jebelovszki E, Kiraly C, Erdei N, Feher A, Pasztor ET, Rutkai I, Forster T, Edes I, Koller A, Bagi Z. (2008) High-fat diet-induced obesity leads to increased NO sensitivity of rat coronary arterioles: role of soluble guanylate cyclase activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 294(6):H2558-2564.
- Jensen J, Lendorf A, Stimpel H, Frost J, Ibsen H, Rosenkilde P. (1999) The prevalence and etiology of impotence in 101 male hypertensive outpatients. *Am J Hypertens*. 12(3):271-275.
- Jensen PE, Mulvany MJ, Aalkjaer C. (1992) Endogenous and exogenous agonist-induced changes in the coupling between [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> and force in rat resistance arteries. *Pflugers Arch*. 420(5-6):536-543.
- Jeremy JY, Angelini GD, Khan M, Mikhailidis DP, Morgan RJ, Thompson CS, Bruckdorfer KR, Naseem KM. (2000) Platelets, oxidant stress and erectile dysfunction: an hypothesis. *Cardiovasc Res*. 46(1):50-54.
- Jeremy JY, Mikhailidis DP, Thompson CS, Dandona P. (1986) The effect of cigarette smoke and diabetes mellitus on muscarinic stimulation of prostacyclin synthesis by the rat penis. *Diabetes Res*. 3(9):467-469.
- Jerums G, Panagiotopoulos S, Forbes J, Osicka T, Cooper M. (2003) Evolving concepts in advanced glycation, diabetic nephropathy, and diabetic vascular disease. *Arch Biochem Biophys*. 419(1):55-62.
- Jesmin S, Sakuma I, Salah-Eldin A, Nonomura K, Hattori Y, Kitabatake A. (2003) Diminished penile expression of vascular endothelial growth factor and its receptors at the insulin-resistant stage of a type II diabetic rat model: a possible cause for erectile dysfunction in diabetes. *J Mol Endocrinol*. 31(3):401-418.
- Jialal I, Devaraj S, Venugopal SK. (2004) C-reactive protein: risk marker or mediator in atherothrombosis?. *Hypertension*. 44(1):6-11.
- Jiang R, Chen JH, Jin J, Shen W, Li QM. (2005) Ultrastructural comparison of penile cavernous tissue between hypertensive and normotensive rats. *Int J Impot Res*. 17(5):417-423.
- Jiang ZY, Lin YW, Clemont A, Feener EP, Hein KD, Igarashi M, Yamauchi T, White MF, King GL. (1999) Characterization of selective resistance to insulin signaling in the vasculature of obese Zucker (fa/fa) rats. *J Clin Invest*. 104(4):447-457.

- Jin L, Ying Z, Webb RC. (2004) Activation of Rho/Rho kinase signaling pathway by reactive oxygen species in rat aorta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 287(4):H1495-1500.
- Joannides R, Haefeli WE, Linder L, Richard V, Bakkali EH, Thuillez C, Lüscher TF. (1995) Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation*. 91(5):1314-1319.
- Jones CJ, Kuo L, Davis MJ, Chilian WM. (1995) Regulation of coronary blood flow: coordination of heterogeneous control mechanisms in vascular microdomains. *Cardiovasc Res*. 29(5):585-596.
- Jones RW, Rees RW, Minhas S, Ralph D, Persad RA, Jeremy JY. (2002) Oxygen free radicals and the penis. *Expert Opin Pharmacother*. 3(7):889-897.
- Jové M, Planavila A, Laguna JC, Vázquez-Carrera M. (2005) Palmitate-induced interleukin 6 production is mediated by protein kinase C and nuclear-factor kappaB activation and leads to glucose transporter 4 down-regulation in skeletal muscle cells. *Endocrinology*. 146:3087-3095.
- Kahn AM, Allen JC, Seidel CL, Song T. (1994) Insulin inhibits serotonin-induced  $Ca^{2+}$  influx in vascular smooth muscle. *Circulation*. 90(1):384-390.
- Kahn AM, Husid A, Allen JC, Seidel CL, Song T. (1997) Insulin acutely inhibits cultured vascular smooth muscle cell contraction by a nitric oxide synthase-dependent pathway. *Hypertension*. 30(4):928-933.
- Kahn AM, Lichtenberg RA, Allen JC, Seidel CL, Song T. (1995) Insulin-stimulated glucose transport inhibits  $Ca^{2+}$  influx and contraction in vascular smooth muscle. *Circulation*. 15;92(6):1597-1603.
- Kahn AM, Seidel CL, Allen JC, O'Neil RG, Shelat H, Song T. (1993) Insulin reduces contraction and intracellular calcium concentration in vascular smooth muscle. *Hypertension*. 22(5):735-742.
- Kahn CR. (1994) Banting Lecture. Insulin action, diabetogenesis, and the cause of type II diabetes. *Diabetes*. 43(8):1066-1084.
- Kamata H, Honda S, Maeda S, Chang L, Hirata H, Karin M. (2005) Reactive oxygen species promote TNF $\alpha$ -induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. *Cell*. 120(5):649-661.
- Kanda T, Wakino S, Homma K, Yoshioka K, Tatematsu S, Hasegawa K, Takamatsu I, Sugano N, Hayashi K, Saruta T. (2006) Rho-kinase as a molecular target for insulin resistance and hypertension. *FASEB J*. 20(1):169-171.
- Kaneda H, Taguchi J, Kuwada Y, Hangaishi M, Aizawa T, Yamakado M, Ogasawara K, Aizawa T, Ohno M. (2006) Coronary artery spasm and the polymorphisms of the endothelial nitric oxide synthase gene. *Circ J*. 70(4):409-413.
- Kanie N, Kamata K. (2002) Effects of chronic administration of the novel endothelin antagonist J-104132 on endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rat. *Br J Pharmacol*. 135(8):1935-1942.
- Katakam PV, Tulbert CD, Snipes JA, Erdős B, Miller AW, Busija DW. (2005) Impaired insulin-induced vasodilation in small coronary arteries of Zucker obese rats is mediated by reactive oxygen species. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 288(2):H854-860.
- Kathryn L. McCance, Sue E. Huether. (2008) Pathophysiology. The Biologic Basis for disease in adults and children. 5ª edición. Editorial Elsevier.
- Kelly-Cobbs AI, Harris AK, Elgebaly MM, Li W, Sachidanandam K, Portik-Dobos V, Johnson M, Ergul A. (2011) Endothelial EndothelinB Receptor-mediated Prevention of Cerebrovascular Remodeling is

- Attenuated in Diabetes Due to Upregulation of Smooth Muscle Endothelin Receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 337(1):9-15.
- Kelly LK, Wedgwood S, Steinhorn RH, Black SM. (2004) Nitric oxide decreases endothelin-1 secretion through the activation of soluble guanylate cyclase. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 286(5):L984-991.
- Kifor I, Williams GH, Vickers MA, Sullivan MP, Jodbert P, Dluhy RG. (1997) Tissue angiotensin II as a modulator of erectile function. I. Angiotensin peptide content, secretion and effects in the corpus cavernosum. *J Urol.* 157(5):1920-1925.
- Kim F, Gallis B, Corson MA. (2001) TNF- $\alpha$  inhibits flow and insulin signaling leading to NO production in aortic endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 280(5):C1057-1065.
- Kim F, Pham M, Maloney E, Rizzo NO, Morton GJ, Wisse BE, Kirk EA, Chait A, Schwartz MW. (2008) Vascular inflammation, insulin resistance, and reduced nitric oxide production precede the onset of peripheral insulin resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 28:1982-1988.
- Kim JA, Koh KK, Quon MJ. (2005) The union of vascular and metabolic actions of insulin in sickness and in health. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 25(5):889-891.
- Kim JA, Montagnani M, Koh KK, Quon MJ. (2006) Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: molecular and pathophysiological mechanisms. *Circulation.* 113(15):1888-1904.
- Kim YC, Zemel MB. (1993) Insulin increases vascular smooth muscle recovery from intracellular calcium loads. *Hypertension.* 22(1):74-77.
- Kirkeby HJ, Jørgensen JC, Ottesen B. (1991) Neuropeptide Y (NPY) in human penile corpus cavernosum tissue and circumflex veins--occurrence and in vitro effects. *J Urol.* 145(3):605-609.
- Kirkeby HJ, Lundbech PE, Djurhuus JC, Forman A. (1992) Effects of vasoactive intestinal peptide, peptide histidine methionine, and neuropeptide Y on intracavernous pressure in the rabbit. *Urology.* 40(3):270-276.
- Knudson JD, Dincer UD, Bratz IN, Sturek M, Dick GM, Tune JD. (2007) Mechanisms of coronary dysfunction in obesity and insulin resistance. *Microcirculation.* 14(4-5):317-338.
- Kobayashi T, Taguchi K, Yasuhiro T, Matsumoto T, Kamata K. (2004) Impairment of PI3-K/Akt pathway underlies attenuated endothelial function in aorta of type 2 diabetic mouse model. *Hypertension.* 44(6):956-962.
- Kuboki K, Jiang ZY, Takahara N, Ha SW, Igarashi M, Yamauchi T, Feener EP, Herbert TP, Rhodes CJ, King GL. (2000) Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells and in vivo : a specific vascular action of insulin. *Circulation.* 101(6):676-681.
- Laakso M, Edelman SV, Brechtel G, Baron AD. (1990) Decreased effect of insulin to stimulate skeletal muscle blood flow in obese man. A novel mechanism for insulin resistance. *J Clin Invest.* 85(6):1844-1852.
- Laakso M, Edelman SV, Brechtel G, Baron AD. (1992) Impaired insulin-mediated skeletal muscle blood flow in patients with NIDDM. *Diabetes.* 41(9):1076-1083.
- Laine H, Nuutila P, Luotolahti M, Meyer C, Elomaa T, Koskinen P, Rönnemaa T, Knuuti J. (2000) Insulin-induced increment of coronary flow reserve is not abolished by dexamethasone in healthy young men. *J Clin Endocrinol Metab.* 85(5):1868-1873.

- Lann D, LeRoith D. (2007) Insulin resistance as the underlying cause for the metabolic syndrome. *Med Clin North Am.* 91(6):1063-1077.
- Latronico MV, Costinean S, Lavitrano ML, Peschele C, Condorelli G. (2004) Regulation of cell size and contractile function by Akt in cardiomyocytes. *Ann N Y Acad Sci.* 1015:250-260.
- Laumann EO, Paik A, Rosen RC. (1999a) Sexual dysfunction in the United States: prevalence and predictors. *JAMA.* 281(6):537-544.
- Laumann EO, Paik A, Rosen RC. (1999b) The epidemiology of erectile dysfunction: results from the National Health and Social Life Survey. *Int J Impot Res.* 11 Suppl 1:S60-64.
- Lautamäki R, Airaksinen KE, Seppänen M, Toikka J, Härkönen R, Luotolahti M, Borra R, Sundell J, Knuuti J, Nuutila P. (2006) Insulin improves myocardial blood flow in patients with type 2 diabetes and coronary artery disease. *Diabetes.* 55(2):511-516.
- Lavie CJ, Messerli FH. (1986) Cardiovascular adaptation to obesity and hypertension. *Chest.* 90(2):275-279.
- Lee DL, Wamhoff BR, Katwa LC, Reddy HK, Voelker DJ, Dixon JL, Sturek M. (2003) Increased endothelin-induced  $Ca^{2+}$  signaling, tyrosine phosphorylation, and coronary artery disease in diabetic dyslipidemic Swine are prevented by atorvastatin. *J Pharmacol Exp Ther.* 306(1):132-140.
- Lerman A, Webster MW, Chesebro JH, Edwards WD, Wei CM, Fuster V, Burnett JC Jr. (1993) Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in hypercholesterolemic pigs. *Circulation.* 88(6):2923-2928.
- Lerman A, Zeiher AM. (2005) Endothelial function: cardiac events. *Circulation.* 111(3):363-368.
- Levin ER. (1995) Endothelins. *N Engl J Med.* 333(6):356-363.
- Lewis EJ, Lewis JB. (2003) Treatment of diabetic nephropathy with angiotensin II receptor antagonist. *Clin Exp Nephrol.* 7(1):1-8.
- Li G, Barrett EJ, Ko SH, Cao W, Liu Z. (2009a) Insulin and insulin-like growth factor-I receptors differentially mediate insulin-stimulated adhesion molecule production by endothelial cells. *Endocrinology.* 150(8):3475-82.
- Li G, Barrett EJ, Wang H, Chai W, Liu Z. (2005) Insulin at physiological concentrations selectively activates insulin but not insulin-like growth factor I (IGF-I) or insulin/IGF-I hybrid receptors in endothelial cells. *Endocrinology.* 146(11):4690-4696.
- Li H, Junk P, Huwiler A, Burkhardt C, Wallerath T, Pfeilschifter J, Förstermann U. (2002a) Dual effect of ceramide on human endothelial cells: induction of oxidative stress and transcriptional upregulation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation.* 106(17):2250-2256.
- Li H, Wallerath T, Münzel T, Förstermann U. (2002b) Regulation of endothelial-type NO synthase expression in pathophysiology and in response to drugs. *Nitric Oxide.* 7(3):149-164.
- Li H, Xu L, Dunbar JC, Dhabuwala CB, Sima AA. (2004) Effects of C-peptide on expression of eNOS and iNOS in human cavernosal smooth muscle cells. *Urology.* 64(3):622-627.
- Li JH, Huang XR, Zhu HJ, Oldfield M, Cooper M, Truong LD, Johnson RJ, Lan HY. (2004a) Advanced glycation end products activate Smad signaling via TGF-beta-dependent and independent mechanisms: implications for diabetic renal and vascular disease. *FASEB J.* 18(1):176-178.

- Li QX, Xiong ZY, Hu BP, Tian ZJ, Zhang HF, Gou WY, Wang HC, Gao F, Zhang QJ. (2009b) Aging-associated insulin resistance predisposes to hypertension and its reversal by exercise: the role of vascular vasorelaxation to insulin. *Basic Res Cardiol*. 104(3):269-284.
- Li SY, Yang X, Ceylan-Isik AF, Du M, Sreejayan N, Ren J. (2006) Cardiac contractile dysfunction in Lep/Lep obesity is accompanied by NADPH oxidase activation, oxidative modification of sarco(endo)plasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase and myosin heavy chain isozyme switch. *Diabetologia*. 49(6):1434-1446.
- Liang C, Doherty JU, Faillace R, Maekawa K, Arnold S, Gavras H, Hood WB Jr. (1982) Insulin infusion in conscious dogs. Effects on systemic and coronary hemodynamics, regional blood flows, and plasma catecholamines. *J Clin Invest*. 69(6):1321-1336.
- Libby P. (2002) Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 420(6917):868-874.
- Liu S, Premont RT, Kontos CD, Huang J, Rockey DC. (2003) Endothelin-1 activates endothelial cell nitric-oxide synthase via heterotrimeric G-protein betagamma subunit signaling to protein kinase B/Akt. *J Biol Chem*. 278(50):49929-49935.
- Lopaschuk GD, Ussher JR, Folmes CD, Jaswal JS, Stanley WC. (2010) Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiol Rev*. 90:207-258.
- Lowell BB, Shulman GI. (2005) Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. *Science*. 307:384-387.
- Lüscher TF, Creager MA, Beckman JA, Cosentino F. (2003) Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: Part II. *Circulation*. 108(13):1655-1661.
- Lteif A, Vaishnava P, Baron AD, Mather KJ. (2007) Endothelin limits insulin action in obese/insulin-resistant humans. *Diabetes*. 56:728-734.
- Luttrell IP, Swee M, Starcher B, Parks WC, Chitaley K. (2008) Erectile dysfunction in the type II diabetic db/db mouse: impaired venoocclusion with altered cavernosal vasoreactivity and matrix. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 294(5):H2204-2211.
- Ma H, Zhang HF, Yu L, Zhang QJ, Li J, Huo JH, Li X, Guo WY, Wang HC, Gao F. (2006) Vasculoprotective effect of insulin in the ischemic/reperfused canine heart: role of Akt-stimulated NO production. *Cardiovasc Res*. 69(1):57-65.
- MacDonald PE, Wheeler MB. (2003) Voltage-dependent  $\text{K}^{+}$  channels in pancreatic beta cells: role, regulation and potential as therapeutic targets. *Diabetologia*. 46(8):1046-1062.
- Maddux BA, See W, Lawrence JC JR, Goldfine AL, Goldfine ID, Evans JL. (2001) Protection against oxidative stress-induced insulin resistance in rat L6 muscle cells by micromolar concentrations of alpha-lipoic acid. *Diabetes*. 50:404-410.
- Madonna R, De Caterina R. (2009) Prolonged exposure to high insulin impairs the endothelial PI3-kinase/Akt/nitric oxide signalling. *Thromb Haemost*. 101(2):345-350.
- Madonna R, Massaro M, Pandolfi A, Consoli A, De Caterina R. (2007) The prominent role of p38 mitogen-activated protein kinase in insulin-mediated enhancement of VCAM-1 expression in endothelial cells. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 20(3):539-555.
- Madonna R, Pandolfi A, Massaro M, Consoli A, De Caterina R. (2004) Insulin enhances vascular cell adhesion molecule-1 expression in human cultured endothelial cells through a pro-atherogenic pathway mediated by p38 mitogen-activated protein-kinase. *Diabetologia*. 47(3):532-536.
- Maier S, Aulbach F, Simm A, Lange V, Langenfeld H, Behre H, Kersting U, Walter U, Kirstein M. (1999) Stimulation of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current in human atrial myocytes by insulin. *Cardiovasc Res*. 44:390-397.



- Makhsida N, Shah J, Yan G, Fisch H, Shabsigh R. (2005) Hypogonadism and metabolic syndrome: implications for testosterone therapy. *J Urol.* 174(3):827-834.
- Marasciulo FL, Montagnani M, Potenza MA. (2006) Endothelin-1: the yin and yang on vascular function. *Curr Med Chem.* 13(14):1655-1665.
- Marshall JM. (1982) The influence of the sympathetic nervous system on individual vessels of the microcirculation of skeletal muscle of the rat. *J Physiol.* 332:169-186.
- Martin JW, Briesmiester K, Bargardi A, Muzik O, Mosca L, Duvernoy CS. (2005) Weight changes and obesity predict impaired resting and endothelium-dependent myocardial blood flow in postmenopausal women. *Clin Cardiol.* 28(1):13-18.
- Martínez AC, Hernández M, Rivera L, Recio P, García-Sacristán A, Benedito S. (2003) Muscarinic receptor subtypes mediate vasorelaxation in isolated horse deep dorsal penile vein. *Urology.* 62(2):357-361.
- Mather KJ, Lteif A, Steinberg HO, Baron AD. (2004) Interactions between endothelin and nitric oxide in the regulation of vascular tone in obesity and diabetes. *Diabetes.* 53(8):2060-2066.
- Mather KJ, Mirzamohammadi B, Lteif A, Steinberg HO, Baron AD. (2002) Endothelin contributes to basal vascular tone and endothelial dysfunction in human obesity and type 2 diabetes. *Diabetes.* 51(12):3517-3523.
- Mather KJ, Verma S, Anderson TJ. (2001) Improved endothelial function with metformin in type 2 diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol.* 37(5):1344-1350.
- Matsumoto T, Yoshiyama S, Kobayashi T, Kamata K. (2004) Mechanisms underlying enhanced contractile response to endothelin-1 in diabetic rat basilar artery. *Peptides.* 25(11):1985-1994.
- Mazo E, Gamidov S, Anranovich S, Iremashvili V. (2006) Testing endothelial function of brachial and cavernous arteries in patients with erectile dysfunction. *J Sex Med.* 3(2):323-330.
- McClain DA, Maegawa H, Lee J, Dull TJ, Ulrich A, Olefsky JM. (1987) A mutant insulin receptor with defective tyrosine kinase displays no biologic activity and does not undergo endocytosis. *J Biol Chem.* 262(30):14663-14671.
- McDowell SA, McCall E, Matter WF, Estridge TB, Vlahos CJ. (2004) Phosphoinositide 3-kinase regulates excitation-contraction coupling in neonatal cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 286(2):H796-805.
- McNulty PH, Pfau S, Deckelbaum LI. (2000) Effect of plasma insulin level on myocardial blood flow and its mechanism of action. *Am J Cardiol.* 85(2):161-165.
- McVeigh GE, Brennan GM, Johnston GD, McDermott BJ, McGrath LT, Henry WR, Andrews JW, Hayes JR. (1992) Impaired endothelium-dependent and independent vasodilation in patients with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia.* 35(8):771-776.
- Meuleman EJ. (2002) Prevalence of erectile dysfunction: need for treatment? *Int J Impot Res.* 14 Suppl 1:S22-28.
- Michael MD, Kulkarni RN, Postic C, Previs SF, Shulman GI, Magnuson MA, Kahn CR. (2000) Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction. *Mol Cell.* 6(1):87-97.
- Miele C, Riboulet A, Maitan MA, Oriente F, Romano C, Formisano P, Giudicelli J, Beguinot F, Van Obberghen E. (2003) Human glycated albumin affects glucose metabolism in L6 skeletal muscle cells

- by impairing insulin-induced insulin receptor substrate (IRS) signaling through a protein kinase C alpha-mediated mechanism. *J Biol Chem.* 278:47376-47387.
- Miles PD, Levisetti M, Reichart D, Khoursheed M, Moossa AR, Olefsky JM. (1995) Kinetics of insulin action in vivo. Identification of rate-limiting steps. *Diabetes.* 44(8):947-953.
- Miller AW, Tulbert C, Puskar M, Busija DW. (2002) Enhanced endothelin activity prevents vasodilation to insulin in insulin resistance. *Hypertension.* 40(1):78-82.
- Mills TM. (2002) Vasoconstriction and vasodilation in erectile physiology. *Curr Urol Rep.* 3(6):477-483.
- Mills TM, Pollock DM, Lewis RW, Branam HS, Wingard CJ. (2001) Endothelin-1-induced vasoconstriction is inhibited during erection in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 281(2):R476-483.
- Min JK, Kim YM, Kim SW, Kwon MC, Kong YY, Hwang IK, Won MH, Rho J, Kwon YG. (2005) TNF-related activation-induced cytokine enhances leukocyte adhesiveness: induction of ICAM-1 and VCAM-1 via TNF receptor-associated factor and protein kinase C-dependent NF-kappaB activation in endothelial cells. *J Immunol.* 175(1):531-540.
- Ming XF, Viswambharan H, Barandier C, Ruffieux J, Kaibuchi K, Rusconi S, Yang Z. (2002) Rho GTPase/Rho kinase negatively regulates endothelial nitric oxide synthase phosphorylation through the inhibition of protein kinase B/Akt in human endothelial cells. *Mol Cell Biol.* 22(24):8467-8477.
- Minhas S, Cartledge J, Eardley I. (2000) The role of prostaglandins in penile erection. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 62(3):137-146.
- Miura H, Liu Y, Gutterman DD. (1999) Human coronary arteriolar dilation to bradykinin depends on membrane hyperpolarization: contribution of nitric oxide and  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channels. *Circulation.* 99(24):3132-3138.
- Miyamoto N, de Kozak Y, Jeanny JC, Glotin A, Mascarelli F, Massin P, BenEzra D, Behar-Cohen F. (2007) Placental growth factor-1 and epithelial haemato-retinal barrier breakdown: potential implication in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Diabetologia.* 50(2):461-470.
- Mohazzab KM, Kaminski PM, Wolin MS. (1994) NADH oxidoreductase is a major source of superoxide anion in bovine coronary artery endothelium. *Am J Physiol.* 266(6 Pt 2):H2568-2572.
- Moller DE, Yokota A, White MF, Pazianos AG, Flier JS. (1990) A naturally occurring mutation of insulin receptor alanine 1134 impairs tyrosine kinase function and is associated with dominantly inherited insulin resistance. *J Biol Chem.* 265(25):14979-14985
- Molnar J, Yu S, Mzhavia N, Pau C, Chereshnev I, Dansky HM. (2005) Diabetes induces endothelial dysfunction but does not increase neointimal formation in high-fat diet fed C57BL/6J mice. *Circ Res.* 96(11):1178-1184.
- Moncada S, Higgs A. (1993) The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med.* 329(27):2002-2012.
- Monga M. (1999) The aging penis: erectile dysfunction. *Geriatr Nephrol Urol.* 9(1):27-37.
- Montagnani M, Chen H, Barr VA, Quon MJ. (2001) Insulin-stimulated activation of eNOS is independent of  $\text{Ca}^{2+}$  but requires phosphorylation by Akt at Ser(1179). *J Biol Chem.* 276(32):30392-30398.
- Montagnani M, Golovchenko I, Kim I, Koh GY, Goalstone ML, Mundhekar AN, Johansen M, Kucik DF, Quon MJ, Draznin B. (2002a) Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase enhances mitogenic actions of insulin in endothelial cells. *J Biol Chem.* 277(3):1794-1799.

- Montagnani M, Ravichandran LV, Chen H, Esposito DL, Quon MJ. (2002b) Insulin receptor substrate-1 and phosphoinositide-dependent kinase-1 are required for insulin-stimulated production of nitric oxide in endothelial cells. *Mol Endocrinol*. 16(8):1931-1942.
- Montorsi F, Briganti A, Salonia A, Rigatti P, Margonato A, Macchi A, Galli S, Ravagnani PM, Montorsi P. (2003a) Erectile dysfunction prevalence, time of onset and association with risk factors in 300 consecutive patients with acute chest pain and angiographically documented coronary artery disease. *Eur Urol*. 44(3):360-365.
- Montorsi P, Montorsi F, Schulman CC. (2003b) Is erectile dysfunction the "tip of the iceberg" of a systemic vascular disorder?. *Eur Urol*. 44(3):352-354.
- Montorsi P, Ravagnani PM, Galli S, Rotatori F, Briganti A, Salonia A, Rigatti P, Montorsi F. *Am J Cardiol*. (2005) The artery size hypothesis: a macrovascular link between erectile dysfunction and coronary artery disease. 96(12B):19M-23M.
- Montorsi P, Ravagnani PM, Galli S, Rotatori F, Veglia F, Briganti A, Salonia A, Dehò F, Rigatti P, Montorsi F, Fiorentini C. (2006) Association between erectile dysfunction and coronary artery disease. Role of coronary clinical presentation and extent of coronary vessels involvement: the COBRA trial. *Eur Heart J*. 27(22):2632-2639.
- Morano S, Gatti A, Mandosi E, Tiberti C, Fallarino M, Cipriani R, Buchetti B, Gandini L, Sgrò P, Jannini EA, Lenti L, Lenzi A. (2007) Circulating monocyte oxidative activity is increased in patients with type 2 diabetes and erectile dysfunction. *J Urol*. 177(2):655-659.
- Morawietz H, Duerschmidt N, Niemann B, Galle J, Sawamura T, Holtz J. (2002) Augmented endothelial uptake of oxidized low-density lipoprotein in response to endothelin-1. *Clin Sci (Lond)*. 103(Suppl 48):9S-12S.
- Moreland RB, Albadawi H, Bratton C, Patton G, Goldstein I, Traish A, Watkins MT. (2001) O<sub>2</sub>-dependent prostanoid synthesis activates functional PGE receptors on corpus cavernosum smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 281(2):H552-558.
- Mount PF, Kemp BE, Power DA. (2007) Regulation of endothelial and myocardial NO synthesis by multi-site eNOS phosphorylation. *J Mol Cell Cardiol*. 42(2):271-279.
- Muecler M. (1994) Facilitative glucose transporters. *Eur J Biochem*. 219:713-725.
- Mulvany MJ, Halpern W. (1977) Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circ Res*. 41(1):19-26.
- Muniyappa R, Iantorno M, Quon MJ. (2008) An integrated view of insulin resistance and endothelial dysfunction. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 37(3):685-711.
- Muniyappa R, Montagnani M, Koh KK, Quon MJ. (2007) Cardiovascular actions of insulin. *Endocr Rev*. 28:463-491.
- Murakoshi N, Miyauchi T, Kakinuma Y, Ohuchi T, Goto K, Yanagisawa M, Yamaguchi I. (2002) Vascular endothelin-B receptor system in vivo plays a favorable inhibitory role in vascular remodeling after injury revealed by endothelin-B receptor-knockout mice. *Circulation*. 106(15):1991-1998.
- Musicki B, Burnett AL. (2007) Endothelial dysfunction in diabetic erectile dysfunction. *Int J Impot Res*. 19(2):129-138.
- Musicki B, Kramer MF, Becker RE, Burnett AL. (2005) Inactivation of phosphorylated endothelial nitric oxide synthase (Ser-1177) by O-GlcNAc in diabetes-associated erectile dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102(33):11870-11875.

- Myung SC, Keum EM, Park SY, Lee MY, Kim SC. (2006) Vasomotor action of insulin on the rabbit normal cavernous smooth muscle. *Eur J Pharmacol.* 536(1-2):142-147.
- Nahser PJ Jr, Brown RE, Oskarsson H, Winniford MD, Rossen JD. (1995) Maximal coronary flow reserve and metabolic coronary vasodilation in patients with diabetes mellitus. *Circulation.* 91(3):635-640.
- Naik JS, Xiang L, Hester RL. (2006) Enhanced role for RhoA-associated kinase in adrenergic-mediated vasoconstriction in gracilis arteries from obese Zucker rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 290(1):R154-161.
- Nangle MR, Cotter MA, Cameron NE. (2003) Protein kinase C beta inhibition and aorta and corpus cavernosum function in streptozotocin-diabetic mice. *Eur J Pharmacol.* 475(1-3):99-106.
- Nangle MR, Cotter MA, Cameron NE. (2006) Correction of nitrgic neurovascular dysfunction in diabetic mouse corpus cavernosum by p38 mitogen-activated protein kinase inhibition. *Int J Impot Res.* 18(3):258-263.
- Nascimento NR, Lessa LM, Kerntopf MR, Sousa CM, Alves RS, Queiroz MG, Price J, Heimark DB, Larner J, Du X, Brownlee M, Gow A, Davis C, Fonteles MC. (2006) Inositols prevent and reverse endothelial dysfunction in diabetic rat and rabbit vasculature metabolically and by scavenging superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(1):218-23.
- Nathan C, Xie QW. (1994) Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell.* 78(6):915-918.
- Nguyen MT, Satoh H, Favelyukis S, Babendure JL, Imamura T, Sbodio JI, Zalevsky J, Dahiyat BI, Chi NW, Olefsky JM. (2005) JNK and tumor necrosis factor-alpha mediate free fatty acid-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem.* 280:35361-35371.
- Niemann B, Rohrbach S, Catar RA, Muller G, Barton M, Morawietz H. (2005) Native and oxidized low-density lipoproteins stimulate endothelinconverting enzyme-1 expression in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 334:747-753.
- Nilsson D, Gustafsson L, Wackenfors A, Gesslein B, Edvinsson L, Paulsson P, Ingemansson R, Malmsjö M. (2008) Up-regulation of endothelin type B receptors in the human internal mammary artery in culture is dependent on protein kinase C and mitogen-activated kinase signaling pathways. *BMC Cardiovasc Disord.* 8:21.
- Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek MA, Beebe D, Oates PJ, Hammes HP, Giardino I, Brownlee M. (2000) Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature.* 404(6779):787-790.
- Nitenberg A, Valensi P, Sachs R, Dali M, Aptekar E, Attali JR. (1993) Impairment of coronary vascular reserve and ACh-induced coronary vasodilation in diabetic patients with angiographically normal coronary arteries and normal left ventricular systolic function. *Diabetes.* 42(7):1017-1025.
- Nitert MD, Chisalita SI, Olsson K, Bornfeldt KE, Arnqvist HJ. (2005) IGF-I/insulin hybrid receptors in human endothelial cells. *Mol Cell Endocrinol.* 229(1-2):31-37.
- Nystrom FH, Quon MJ. (1999) Insulin signalling: metabolic pathways and mechanisms for specificity. *Cell Signal.* 11(8):563-574.
- Odoni G, Ritz E. J. (1999) Diabetic nephropathy--what have we learned in the last three decades? *Nephrol.* 12 Suppl 2:S120-124.
- Okabe H, Hale TM, Kumon H, Heaton JP, Adams MA. (1999) The penis is not protected--in hypertension there are vascular changes in the penis which are similar to those in other vascular beds. *Int J Impot Res.* 11(3):133-140.

- Okon EB, Chung AW, Rauniyar P, Padilla E, Tejerina T, McManus BM, Luo H, van Breemen C. (2005) Compromised arterial function in human type 2 diabetic patients. *Diabetes*. 54(8):2415-2423.
- Oltman CL, Kane NL, Gutterman DD, Bar RS, Dellsperger KC. (2000) Mechanism of coronary vasodilation to insulin and insulin-like growth factor I is dependent on vessel size. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 279(1):E176-181.
- Oltman CL, Richou LL, Davidson EP, Coppey LJ, Lund DD, Yorek MA. (2006) Progression of coronary and mesenteric vascular dysfunction in Zucker obese and Zucker diabetic fatty rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 291(4):H1780-1787.
- Opie LH. (1998) *The heart*. Lippincott-raven 3ª edición.
- Ortmann J, Traupe T, Nett P, Celeiro J, Hofmann-Lehmann R, Lange M, Vetter W, Barton M. (2004) Upregulation of vascular ET(B) receptor gene expression after chronic ET(A) receptor blockade in prediabetic NOD mice. *J Cardiovasc Pharmacol*. 44 Suppl 1:S105-108.
- Ouwens DM, Boer C, Fodor M, De Galan P, Heine RJ, Maassen JA, Diamant M. (2005) Cardiac dysfunction induced by high-fat diet is associated with altered myocardial insulin signalling in rats. *Diabetologia*. 48:1229-1237.
- Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E, Tuncman G, Görgn C, Glimcher LH, Hotamisligil GS. (2004) Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science*. 306(5695):457-461.
- Paniagua OA, Bryant MB, Panza JA. (2001) Role of endothelial nitric oxide in shear stress-induced vasodilation of human microvasculature: diminished activity in hypertensive and hypercholesterolemic patients. *Circulation*. 103(13):1752-1758.
- Park JK, Kim SZ, Kim SH, Park YK, Cho KW. (1997) Renin angiotensin system in rabbit corpus cavernosum: functional characterization of angiotensin II receptors. *J Urol*. 158(2):653-658.
- Parkkisenniemi UM, Palkama A, Virtanen I, Klinge E. (2000) The endothelin ET(B) receptor agonist [125I]BQ-3020 binds predominantly to nerves in the bovine retractor penis muscle and penile artery. *Pharmacol Toxicol*. 87(5):234-241.
- Patti ME. (2004) Gene expression in the pathophysiology of type 2 diabetes mellitus. *Curr Diab Rep*. 4(3):176-181.
- Peng HB, Libby P, Liao JK. (1995) Induction and stabilization of I kappa B alpha by nitric oxide mediates inhibition of NF-kappa B. *J Biol Chem*. 270(23):14214-14219.
- Petersen KF, Befroy D, Dufour S, Dziura J, Ariyan C, Rothman DL, DiPietro L, Cline GW, Shulman GI. (2003) Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance. *Science*. 300(5622):1140-1142.
- Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Garcia R, Shulman GI. (2004) Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. *Vasc Med*. 9(3):223-224.
- Piatti PM, Monti LD, Conti M, Baruffaldi L, Galli L, Phan CV, Guazzini B, Pontiroli AE, Pozza G. (1996) Hypertriglyceridemia and hyperinsulinemia are potent inducers of endothelin-1 release in humans. *Diabetes*. 45(3):316-321.
- Pinnock CB, Stapleton AM, Marshall VR. (1999) Erectile dysfunction in the community: a prevalence study. *Med J Aust*. 171(7):353-357.
- Pocock G, Richards CD. (2002) *Fisiología humana La base de la medicina*, Masson. 2ª edición.

- Pollock DM. (2010) Dissecting the complex physiology of endothelin: new lessons from genetic models. *Hypertension*. 56(1):31-33.
- Posch K, Simecek S, Wascher TC, Jrgens G, Baumgartner-Parzer S, Kostner GM, Graier WF. (1999) Glycated low-density lipoprotein attenuates shear stress-induced nitric oxide synthesis by inhibition of shear stress-activated L-arginine uptake in endothelial cells. *Diabetes*. 48(6):1331-1337.
- Potenza MA, Addabbo F, Montagnani M. (2009) Vascular actions of insulin with implications for endothelial dysfunction. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 297(3):E568-577.
- Potenza MA, Marasciulo FL, Chieppa DM, Brigiani GS, Formoso G, Quon MJ, Montagnani M. (2005) Insulin resistance in spontaneously hypertensive rats is associated with endothelial dysfunction characterized by imbalance between NO and ET-1 production. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 289:H813-822.
- Potenza MA, Montagnani M. (2008) Abnormal insulin signaling: early detection of silent coronary artery disease-erectile dysfunction? *Curr Pharm Des*. 14(35):3737-3748.
- Prabhakar SS. (2004) Role of nitric oxide in diabetic nephropathy. *Semin Nephrol*. 24(4):333-344.
- Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. (2001) C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA*. 286:327-334.
- Prieto D. (2008) Physiological regulation of penile arteries and veins. *Int J Impot Res*. 20(1):17-29.
- Prieto D, Arcos LR, Martínez P, Benedito S, García-Sacristán A, Hernández M. (2004) Heterogeneity of the neuropeptide Y (NPY) contractile and relaxing receptors in horse penile small arteries. *Br J Pharmacol*. 143(8):976-986.
- Prieto D, Buus C, Mulvany MJ, Nilsson H. (1997) Interactions between neuropeptide Y and the adenylate cyclase pathway in rat mesenteric small arteries: role of membrane potential. *J Physiol*. 502 ( Pt 2):281-292.
- Prieto D, Buus CL, Mulvany MJ, Nilsson H. (2000) Neuropeptide Y regulates intracellular calcium through different signalling pathways linked to a Y(1)-receptor in rat mesenteric small arteries. *Br J Pharmacol*. 129(8):1689-1699.
- Prieto D, Simonsen U, Hernández M, García-Sacristán A. (1998) Contribution of K<sup>+</sup> channels and ouabain-sensitive mechanisms to the endothelium-dependent relaxations of horse penile small arteries. *Br J Pharmacol*. 123(8):1609-1620.
- Prior JO, Quiñones MJ, Hernandez-Pampaloni M, Facta AD, Schindler TH, Sayre JW, Hsueh WA, Schelbert HR. (2005) Coronary circulatory dysfunction in insulin resistance, impaired glucose tolerance, and type 2 diabetes mellitus. *Circulation*. 111(18):2291-2298.
- Pu XY, Wang XH, Gao WC, Yang ZH, Li SL, Wang HP, Wu YL. (2008) Insulin-like growth factor-1 restores erectile function in aged rats: modulation the integrity of smooth muscle and nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate signaling activity. *J Sex Med*. 5(6):1345-54.
- Quagliaro L, Piconi L, Assaloni R, Da Ros R, Maier A, Zuodar G, Ceriello A. (2005) Intermittent high glucose enhances ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin expression in human umbilical vein endothelial cells in culture: the distinct role of protein kinase C and mitochondrial superoxide production. *Atherosclerosis*. 183(2):259-267.
- Rabini RA, Staffolani R, Fumelli P, Mutus B, Curatola G, Mazzanti L. (1998) Decreased nitric oxide synthase activity in platelets from IDDM and NIDDM patients. *Diabetologia*. 41(1):101-104.

- Rask-Madsen C, King GL. (2007) Mechanisms of Disease: endothelial dysfunction in insulin resistance and diabetes. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 3(1):46-56.
- Recio P, Prieto D, Martínez MP, García P, Rivera L, Benedito S, Martínez AC, Sacristán AG, Orensanz LM, Hernández M. I. (2004) Immunohistochemical and functional evidence for a noradrenergic regulation in the horse penile deep dorsal vein. *J Impot Res.* 16(6):486-491.
- Rocchini AP, Wilson RF, Marker P, Cervenka T. (1996) Metabolic and hemodynamic effects of a graded intracoronary insulin infusion in normal and fat anesthetized dogs: a preliminary study. *Hypertension.* 27(3 Pt 1):354-359.
- Rondelet B, Kerbaul F, Motte S, van Beneden R, Rimmelink M, Brimiouille S, McEntee K, Wauthy P, Salmon I, Ketelslegers JM, Naeije R. (2003) Bosentan for the prevention of overcirculation-induced experimental pulmonary arterial hypertension. *Circulation.* 107(9):1329-1335.
- Rodriguez JJ, Al Dashti R, Schwarz ER. (2005) Linking erectile dysfunction and coronary artery disease. *Int J Impot Res.* 17 Suppl 1:S12-18.
- Rosen RC, Fisher WA, Eardley I, Niederberger C, Nadel A, Sand M;. (2004) The multinational Men's Attitudes to Life Events and Sexuality (MALES) study: I. Prevalence of erectile dysfunction and related health concerns in the general population. *Curr Med Res Opin.* 20(5):607-617.
- Ross RM, Kolka CM, Rattigan S, Clark MG. (2007) Acute blockade by endothelin-1 of haemodynamic insulin action in rats. *Diabetologia.* 50(2):443-451.
- Rossetti L. (2000) Perspective: Hexosamines and nutrient sensing. *Endocrinology.* 141(6):1922-1325.
- Rota M, Boni A, Urbanek K, Padin-Iruegas ME, Kajstura TJ, Fiore G, Kubo H, Sonnenblick EH, Musso E, Houser SR, Leri A, Sussman MA, Anversa P. (2005) Nuclear targeting of Akt enhances ventricular function and myocyte contractility. *Circ Res.* 97:1332-1341.
- Rudich A, Tirosh A, Potashnik R, Hemi R, Kanety H, Bashan N. (1998) Prolonged oxidative stress impairs insulin-induced GLUT4 translocation in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes.* 47(10):1562-1569.
- Ruiz Rubio JL, Hernández M, Rivera de los Arcos L, Martínez AC, García-Sacristán A, Prieto D. (2004) Mechanisms of prostaglandin E1-induced relaxation in penile resistance arteries. *J Urol.* 171(2 Pt 1):968-973.
- Rumble JR, Cooper ME, Soulis T, Cox A, Wu L, Youssef S, Jasik M, Jerums G, Gilbert RE. (1997) Vascular hypertrophy in experimental diabetes. Role of advanced glycation end products. *J Clin Invest.* 99(5):1016-1027.
- Ryu JK, Kim DJ, Lee T, Kang YS, Yoon SM, Suh JK. (2003) The role of free radical in the pathogenesis of impotence in streptozotocin-induced diabetic rats. *Yonsei Med J.* 44(2):236-241.
- Sachidanandam K, Elgebaly MM, Harris AK, Hutchinson JR, Mezzetti EM, Portik-Dobos V, Ergul A. (2008) Effect of chronic and selective endothelin receptor antagonism on microvascular function in type 2 diabetes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 294(6):H2743-2749.
- Sachidanandam K, Harris A, Hutchinson J, Ergul A. (2006) Microvascular versus macrovascular dysfunction in type 2 diabetes: differences in contractile responses to endothelin-1. *Exp Biol Med* 231(6):1016-1021.
- Sachidanandam K, Portik-Dobos V, Harris AK, Hutchinson JR, Muller E, Johnson MH, Ergul A. (2007) Evidence for vasculoprotective effects of ET<sub>B</sub> receptors in resistance artery remodeling in diabetes. *Diabetes.* 56(11):2753-2758.

- Sáenz de Tejada I, Angulo J, Celtek S, González-Cadavid N, Heaton J, Pickard R, Simonsen U. (2004) Physiology of erectile function. *J Sex Med.* 1(3):254-265.
- Saenz de Tejada I, Goldstein I, Azadzi K, Krane RJ, Cohen RA. (1989) Impaired neurogenic and endothelium-mediated relaxation of penile smooth muscle from diabetic men with impotence. *N Engl J Med.* 20;320(16):1025-30.
- Saito M, Ishimitsu T, Minami J, Ono H, Ohrai M, Matsuoka H. (2003) Relations of plasma high-sensitivity C-reactive protein to traditional cardiovascular risk factors. *Atherosclerosis.* 167(1):73-79.
- Salt IP, Morrow VA, Brandie FM, Connell JM, Petrie JR. (2003) High glucose inhibits insulin-stimulated nitric oxide production without reducing endothelial nitric-oxide synthase Ser1177 phosphorylation in human aortic endothelial cells. *J Biol Chem.* 278(21):18791-18797.
- Saltiel AR, Kahn CR. (2001) Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature.* 414(6865):799-806.
- Sánchez A, Contreras C, Martínez P, Villalba N, Benedito S, García-Sacristán A, Saláces M, Hernández M, Prieto D. (2010) Enhanced cyclooxygenase 2-mediated vasorelaxation in coronary arteries from insulin-resistant obese Zucker rats. *Atherosclerosis.* 213(2):392-399.
- Sánchez A, Contreras C, Villalba N, Martínez P, Martínez AC, Briones A, Saláces M, García-Sacristán A, Hernández M, Prieto D. (2010) Altered arachidonic acid metabolism via COX-1 and COX-2 contributes to the endothelial dysfunction of penile arteries from obese Zucker rats. *Br J Pharmacol.* 159(3):604-616.
- Satchell SC, Tooke JE. (2008) What is the mechanism of microalbuminuria in diabetes: a role for the glomerular endothelium?. *Diabetologia.* 51(5):714-725.
- Sauzeau V, Rolli-Derkinderen M, Marionneau C, Loirand G, Pacaud P. (2003) RhoA expression is controlled by nitric oxide through cGMP-dependent protein kinase activation. *J Biol Chem.* 278(11):9472-80.
- Savage DB, Petersen KF, Shulman GI. (2005) Mechanisms of insulin resistance in humans and possible links with inflammation. *Hypertension.* 45(5):828-33.
- Schindler TH, Cardenas J, Prior JO, Facta AD, Kreissl MC, Zhang XL, Sayre J, Dahlbom M, Licinio J, Schelbert HR. (2006) Relationship between increasing body weight, insulin resistance, inflammation, adipocytokine leptin, and coronary circulatory function. *J Am Coll Cardiol.* 47(6):1188-1195.
- Schmitz-Peiffer C, Biden TJ. (2008) Protein kinase C function in muscle, liver, and beta-cells and its therapeutic implications for type 2 diabetes. *Diabetes.* 57(7):1774-1183.
- Schneider MP, Boesen EI, Pollock DM. (2007) Contrasting actions of endothelin ET(A) and ET(B) receptors in cardiovascular disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 47:731-759.
- Schoenhagen P, Nissen SE. (2004) Coronary atherosclerosis in diabetic subjects: clinical significance, anatomic characteristics, and identification with in vivo imaging. *Cardiol Clin.* 22(4):527-540.
- Seftel AD, Sun P, Swindle R. (2004) The prevalence of hypertension, hyperlipidemia, diabetes mellitus and depression in men with erectile dysfunction. *J Urol.* 171(6 Pt 1):2341-2345.
- Segal MS, Shah R, Afzal A, Perrault CM, Chang K, Schuler A, Beem E, Shaw LC, Li Calzi S, Harrison JK, Tran-Son-Tay R, Grant MB. (2006) Nitric oxide cytoskeletal-induced alterations reverse the endothelial progenitor cell migratory defect associated with diabetes. *Diabetes.* 55(1):102-109.



- Seo KK, Yun HY, Kim H, Kim SC. (1999) Involvement of endothelial nitric oxide synthase in the impaired endothelium-dependent relaxation of cavernous smooth muscle in hypercholesterolemic rabbit. *J Androl.* 20(2):298-306.
- Sessa WC, Kaw S, Hecker M, Vane JR. (1991) The biosynthesis of endothelin-1 by human polymorphonuclear leukocytes. *J Biochem Biophys Res Commun.* 174(2):613-618.
- Shabbir M, Mikhailidis DM, Morgan RJ. (2004) Erectile dysfunction: an underdiagnosed condition associated with multiple risk factors. *Curr Med Res Opin.* 20(5):603-606.
- Shiga N, Hirano K, Hirano M, Nishimura J, Nawata H, Kanaide H. (2005) Long-term inhibition of RhoA attenuates vascular contractility by enhancing endothelial NO production in an intact rabbit mesenteric artery. *Circ Res.* 96(9):1014-1021.
- Shulman GI. (2000) Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest.* 106:171-176.
- Silver AE, Beske SD, Christou DD, Donato AJ, Moreau KL, Eskurza I, Gates PE, Seals DR. (2007) Overweight and obese humans demonstrate increased vascular endothelial NAD(P)H oxidase-p47(phox) expression and evidence of endothelial oxidative stress. *Circulation.* 115(5):627-637.
- Simonsen U, Contreras J, García-Sacristán A, Martínez AC. (2001) Effect of sildenafil on non-adrenergic non-cholinergic neurotransmission in bovine penile small arteries. *Eur J Pharmacol.* 412(2):155-169.
- Simonsen U, García-Sacristán A, Prieto D. (2002) Penile arteries and erection. *J Vasc Res.* 39(4):283-303.
- Simonsen U, Prieto D, Hernández M, Sáenz de Tejada I, García-Sacristán A. (1997a) Adrenoceptor-mediated regulation of the contractility in horse penile resistance arteries. *J Vasc Res.* 34(2):90-102.
- Simonsen U, Prieto D, Hernández M, Sáenz de Tejada I, García-Sacristán A. (1997b) Prejunctional alpha 2-adrenoceptors inhibit nitrenergic neurotransmission in horse penile resistance arteries. *J Urol.* 157(6):2356-2360.
- Simonsen U, Prieto D, Sáenz de Tejada I, García-Sacristán A. (1995) Involvement of nitric oxide in the non-adrenergic non-cholinergic neurotransmission of horse deep penile arteries: role of charybdotoxin-sensitive K(+) -channels. *Br J Pharmacol.* 116(6):2582-90.
- Solomon H, Man JW, Jackson G. (2003) Erectile dysfunction and the cardiovascular patient: endothelial dysfunction is the common denominator. *Heart.* 89(3):251-253.
- Solomon H, Samarasinghe YP, Feher MD, Man J, Rivas-Toro H, Lumb PJ, Wierzbicki AS, Jackson G. (2006) Erectile dysfunction and statin treatment in high cardiovascular risk patients. *Int J Clin Pract.* 60(2):141-145.
- Somlyo AP, Somlyo AV. (1994) Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature.* 372(6503):231-236.
- Somlyo AP, Somlyo AV. (2000) Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *J Physiol.* 522:177-185.
- Somlyo AP, Somlyo AV. (2003) Ca<sup>2+</sup> sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev.* 83(4):1325-1358.
- Somlyo AP, Somlyo AV. (2004) Signal transduction through the RhoA/Rho-kinase pathway in smooth muscle. *J Muscle Res Cell Motil.* 25(8):613-615.
- Sowers JR, Epstein M, Frohlich ED. (2001) Diabetes, hypertension, and cardiovascular disease: an update. *Hypertension.* 37(4):1053-1059.

- Sowers JR. (2004) Insulin resistance and hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 286(5):H1597-1602.
- Standley PR, Ram JL, Sowers JR. (1993) Insulin attenuation of vasopressin-induced calcium responses in arterial smooth muscle from Zucker rats. *Endocrinology.* 133(4):1693-1699.
- Standley PR, Zhang F, Ram JL, Zemel MB, Sowers JR. (1991) Insulin attenuates vasopressin-induced calcium transients and a voltage-dependent calcium response in rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest.* 88(4):1230-1236.
- Steffes MW, Mauer SM. (1991) Diabetic nephropathy: a disease causing and complicated by hypertension. *Clin Chem.* 37(10 Pt 2):1838-1842.
- Steinberg HO, Baron AD. (2002) Vascular function, insulin resistance and fatty acids. *Diabetologia.* 45(5):623-634.
- Steinberg HO, Chaker H, Leaming R, Johnson A, Brechtel G, Baron AD. (1996) Obesity/insulin resistance is associated with endothelial dysfunction. Implications for the syndrome of insulin resistance. *J Clin Invest.* 97(11):2601-2610.
- Steinberg HO, Paradisi G, Cronin J, Crowde K, Hempfling A, Hook G, Baron AD. (2000a) Type II diabetes abrogates sex differences in endothelial function in premenopausal women. *Circulation.* 101(17):2040-2046.
- Steinberg HO, Paradisi G, Hook G, Crowder K, Cronin J, Baron AD. (2000b) Free fatty acid elevation impairs insulin-mediated vasodilation and nitric oxide production. *Diabetes.* 49(7):1231-1238.
- Stenman E, Malmjö M, Uddman E, Gidö G, Wieloch T, Edvinsson L. (2002) Cerebral ischemia upregulates vascular endothelin ET(B) receptors in rat. *Stroke.* 33(9):2311-2316.
- Stepniakowski KT, Sallee FR, Goodfriend TL, Zhang Z, Egan BM. (1996) Fatty acids enhance neurovascular reflex responses by effects on alpha 1-adrenoceptors. *Am J Physiol.* 270(6 Pt 2):R1340-1346.
- Sullivan M, Thompson CS, Mikhailidis DP, Morgan RJ, Angelini GD, Jeremy JY. (1998) Differential alterations of prostacyclin, cyclic AMP and cyclic GMP formation in the corpus cavernosum of the diabetic rabbit. *Br J Urol.* 82(4):578-584.
- Sundell J, Knuuti J. (2003) Insulin and myocardial blood flow. *Cardiovasc Res.* 57:312-329.
- Sundell J, Laine H, Nuutila P, Rönkämaa T, Luotolahti M, Raitakari O, Knuuti J. (2002a) The effects of insulin and short-term hyperglycaemia on myocardial blood flow in young men with uncomplicated Type I diabetes. *Diabetologia.* 45(6):775-782.
- Sundell J, Nuutila P, Laine H, Luotolahti M, Kalliokoski K, Raitakari O, Knuuti J. (2002b) Dose-dependent vasodilating effects of insulin on adenosine-stimulated myocardial blood flow. *Diabetes.* 51(4):1125-1130.
- Sutherland AJ, Nataatmadja MI, Walker PJ, Cuttle L, Garlick RB, West MJ. (2006) Vascular remodeling in the internal mammary artery graft and association with in situ endothelin-1 and receptor expression. *Circulation.* 113(9):1180-1188.
- Suwaidi JA, Wright RS, Grill JP, Hensrud DD, Murphy JG, Squires RW, Kopecky SL. (2001) Obesity is associated with premature occurrence of acute myocardial infarction. *Clin Cardiol.* 24(8):542-547.
- Symons JD, McMillin SL, Riehle C, Tanner J, Palionyte M, Hillas E, Jones D, Cooksey RC, Birnbaum MJ, McClain DA, Zhang QJ, Gale D, Wilson LJ, Abel ED. (2009) Contribution of insulin and Akt1 signaling to

- endothelial nitric oxide synthase in the regulation of endothelial function and blood pressure. *Circ Res.* 104:1085-1094.
- Szerafin T, Erdei N, Flöp T, Pasztor ET, Edes I, Koller A, Bagi Z. (2006) Increased cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin-mediated dilation in coronary arterioles of patients with diabetes mellitus. *Circ Res.* 99(5):e12-17.
- Taddei S, Vanhoutte PM. (1993) Endothelium-dependent contractions to endothelin in the rat aorta are mediated by thromboxane A<sub>2</sub>. *J Cardiovasc Pharmacol.* 22 Suppl 8:S328-331.
- Takahashi S, Mendelsohn ME. (2003) Synergistic activation of endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) by HSP90 and Akt: calcium-independent eNOS activation involves formation of an HSP90-Akt-CaM-bound eNOS complex. *J Biol Chem.* 278(33):30821-30827.
- Takase B, Uehata A, Akima T, Nagai T, Nishioka T, Hamabe A, Satomura K, Ohsuzu F, Kurita A. (1998) Endothelium-dependent flow-mediated vasodilation in coronary and brachial arteries in suspected coronary artery disease. *Am J Cardiol.* 82(12):1535-1539.
- Taner CB, Severson SR, Best PJ, Lerman A, Miller VM. (2001) Treatment with endothelin-receptor antagonists increases NOS activity in hypercholesterolemia. *J Appl Physiol.* 90(3):816-820.
- Tepper OM, Galiano RD, Capla JM, Kalka C, Gagne PJ, Jacobowitz GR, Levine JP, Gurtner GC. (2002) Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. *Circulation.* 106(22):2781-2786.
- Ter Maaten JC, Voorburg A, de Vries PM, ter Wee PM, Donker AJ, Gans RO. (1998) Relationship between insulin's haemodynamic effects and insulin-mediated glucose uptake. *Eur J Clin Invest.* 28(4):279-284.
- Tirapelli CR, Casolari DA, Yogi A, Montezano AC, Tostes RC, Legros E, D'Orléans-Juste P, de Oliveira AM. (2005) Functional characterization and expression of endothelin receptors in rat carotid artery: involvement of nitric oxide, a vasodilator prostanoid and the opening of K<sub>+</sub> channels in ET<sub>B</sub>-induced relaxation. *Br J Pharmacol.* 146(6):903-912.
- Tirupattur PR, Ram JL, Standley PR, Sowers JR. (1993) Regulation of Na,K(+) -ATPase gene expression by insulin in vascular smooth muscle cells. *Am J Hypertens.* 6(7 Pt 1):626-629.
- Touyz RM, Schiffrin EL. (1996) Tyrosine kinase signaling pathways modulate angiotensin II-induced calcium ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) transients in vascular smooth muscle cells. *Hypertension.* 27(5):1097-1103.
- Touyz RM, Tolloczko B, Schiffrin EL. (1994) Insulin attenuates agonist-evoked calcium transients in vascular smooth muscle cells. *Hypertension.* 23(1 Suppl):I25-28.
- Touyz RM, Tolloczko B, Schiffrin EL. (1995) Blunted attenuation of angiotensin II-mediated Ca<sup>2+</sup> transients by insulin in cultured unpassaged vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens.* 8(2):104-112.
- Tripathy D, Mohanty P, Dhindsa S, Syed T, Ghanim H, Aljada A, Dandona P. (2003) Elevation of free fatty acids induces inflammation and impairs vascular reactivity in healthy subjects. *Diabetes.* 52(12):2882-2887.
- Trovati M, Massucco P, Mattiello L, Cavalot F, Mularoni EM, Hahn AW, Anfossi G. (1996) Studies on the influence of insulin on cyclic adenosine monophosphate in human vascular smooth muscle cells: dependence on cyclic guanosine monophosphate and modulation of catecholamine effects. *Diabetologia.* 39:1156-1164.

- Trovati M, Massucco P, Mattiello L, Costamagna C, Aldieri E, Cavalot F, Anfossi G, Bosia A, Ghigo D. (1999) Human vascular smooth muscle cells express a constitutive nitric oxide synthase that insulin rapidly activates, thus increasing guanosine 3':5'-cyclic monophosphate and adenosine 3':5'-cyclic monophosphate concentrations. *Diabetologia*. 42:831-839.
- Tuncayengin A, Biri H, Onaran M, Sen I, Tuncayengin O, Polat F, Erbas D, Bozkirli I. (2003) Cavernosal tissue nitrite, nitrate, malondialdehyde and glutathione levels in diabetic and non-diabetic erectile dysfunction. *Int J Androl*. 26(4):25025-25034.
- Tune JD, Gorman MW, Feigl EO. (2004) Matching coronary blood flow to myocardial oxygen consumption. *J Appl Physiol*. 97(1):404-415.
- Ueno M, Carvalheira JB, Tambascia RC, Bezerra RM, Amaral ME, Carneiro EM, Folli F, Franchini KG, Saad MJ. (2005) Regulation of insulin signalling by hyperinsulinaemia: role of IRS-1/2 serine phosphorylation and the mTOR/p70 S6K pathway. *Diabetologia*. 48(3):506-518.
- Utriainen T, Takala T, Luotolahti M, Ronnema T, Laine H, Ruotsalainen U, Haaparanta M, Nuutila P, Yki-Jarvinen H. (1998) Insulin resistance characterizes glucose uptake in skeletal muscle but not in the heart in NIDDM. *Diabetologia*. 41:555-559.
- Vane JR, Anggård EE, Botting RM. (1990) Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med*. 323(1):27-36.
- Vásquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martásek P, Hogg N, Masters BS, Karoui H, Tordo P, Pritchard KA Jr. (1998) Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95(16):9220-9225.
- Veerababu G, Tang J, Hoffman RT, Daniels MC, Hebert LF Jr, Crook ED, Cooksey RC, McClain DA. (2000) Overexpression of glutamine: fructose-6-phosphate amidotransferase in the liver of transgenic mice results in enhanced glycogen storage, hyperlipidemia, obesity, and impaired glucose tolerance. *Diabetes*. 49(12):2070-2078.
- Verhaar MC, Strachan FE, Newby DE, Cruden NL, Koomans HA, Rabelink TJ, Webb DJ. (1998) Endothelin-A receptor antagonist-mediated vasodilatation is attenuated by inhibition of nitric oxide synthesis and by endothelin-B receptor blockade. *Circulation*. 97(8):752-756.
- Verma S, Buchanan MR, Anderson TJ. *Circulation*. (2003) Endothelial function testing as a biomarker of vascular disease. 108(17):2054-2059.
- Verna E, Ceriani L, Provasoli S, Scotti S, Ghiringhelli S. (2007) Larger perfusion defects with exercise compared with dipyridamole SPECT (exercise-dipyridamole mismatch) may reflect differences in epicardial and microvascular coronary dysfunction: when the stressor matters. *J Nucl Cardiol*. 14(6):818-826.
- Vicent D, Ilany J, Kondo T, Naruse K, Fisher SJ, Kisanuki YY, Bursell S, Yanagisawa M, King GL, Kahn CR. (2003) The role of endothelial insulin signaling in the regulation of vascular tone and insulin resistance. *J Clin Invest*. 111(9):1373-1380.
- Villalba N, Contreras C, Hernández M, García-Sacristán A, Prieto D. (2011) Impaired Ca<sup>2+</sup> handling in penile arteries from prediabetic Zucker rats: involvement of Rho kinase. *AJP-Heart and Circulatory Physiology*. En prensa.
- Villalba N, Martínez P, Briones AM, Sánchez A, Salaíces M, García-Sacristán A, Hernández M, Benedito S, Prieto D. (2009) Differential structural and functional changes in penile and coronary arteries from obese Zucker rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 297(2):H696-707.

- Villalba N, Stankevicius E, Garcia-Sacristán A, Simonsen U, Prieto D. (2007) Contribution of both  $\text{Ca}^{2+}$  entry and  $\text{Ca}^{2+}$  sensitization to the  $\alpha 1$ -adrenergic vasoconstriction of rat penile small arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 292(2):H1157-1169.
- Vincent MA, Clerk LH, Lindner JR, Klibanov AL, Clark MG, Rattigan S, Barrett EJ. (2004) Microvascular recruitment is an early insulin effect that regulates skeletal muscle glucose uptake in vivo. *Diabetes*. 53:1418-1423.
- Vincent MA, Dawson D, Clark AD, Lindner JR, Rattigan S, Clark MG, Barrett EJ. (2002) Skeletal muscle microvascular recruitment by physiological hyperinsulinemia precedes increases in total blood flow. *Diabetes*. 51:42-48.
- Vlassara H, Palace MR. (2002) Diabetes and advanced glycation end products. *J Intern Med*. 251(2):87-101.
- Vogel RA. (1997) Coronary risk factors, endothelial function, and atherosclerosis: a review. *Clin Cardiol*. 20(5):426-432.
- Wackers FJ, Young LH, Inzucchi SE, Chyun DA, Davey JA, Barrett EJ, Taillefer R, Wittlin SD, Heller GV, Filipchuk N, Engel S, Ratner RE, Iskandrian AE. (2004) Detection of silent myocardial ischemia in asymptomatic diabetic subjects: the DIAD study. *Diabetes Care*. 27(8):1954-1961.
- Wallis MG, Wheatley CM, Rattigan S, Barrett EJ, Clark AD, Clark MG. (2002) Insulin-mediated hemodynamic changes are impaired in muscle of Zucker obese rats. *Diabetes*. 51(12):3492-3498.
- Wamhoff BR, Dixon JL, Sturek M. (2002) Atorvastatin treatment prevents alterations in coronary smooth muscle nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in diabetic dyslipidemia. *J Vasc Res*. 39(3):208-220.
- Wang XL, Zhang L, Youker K, Zhang MX, Wang J, LeMaire SA, Coselli JS, Shen YH. (2006) Free fatty acids inhibit insulin signaling-stimulated endothelial nitric oxide synthase activation through upregulating PTEN or inhibiting Akt kinase. *Diabetes*. 55(8):2301-2310.
- Watanabe S, Tagawa T, Yamakawa K, Shimabukuro M, Ueda S. (2005) Inhibition of the renin-angiotensin system prevents free fatty acid-induced acute endothelial dysfunction in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 25(11):2376-2380.
- Wautier MP, Chappey O, Corda S, Stern DM, Schmidt AM, Wautier JL. (2001) Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 280(5):E685-694.
- Wendt T, Harja E, Bucciarelli L, Qu W, Lu Y, Rong LL, Jenkins DG, Stein G, Schmidt AM, Yan SF. (2006) RAGE modulates vascular inflammation and atherosclerosis in a murine model of type 2 diabetes. *Atherosclerosis*. 185(1):70-77.
- Wiecha J, Reineker K, Reitmayer M, Voisard R, Hannekum A, Mattfeldt T, Waltenberger J, Hombach V. (1998) Modulation of  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channels in human vascular cells by insulin and basic fibroblast growth factor. *Growth Horm IGF Res*. 8(2):175-181.
- Wilcox JN, Subramanian RR, Sundell CL, Tracey WR, Pollock JS, Harrison DG, Marsden PA. (1997) Expression of multiple isoforms of nitric oxide synthase in normal and atherosclerotic vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 17(11):2479-2488.
- Winer N, Sowers JR. (2003) Vascular compliance in diabetes. *Curr Diab Rep*. 3(3):230-234.
- Wingard C, Fulton D, Husain S. (2007) Altered penile vascular reactivity and erection in the Zucker obese-diabetic rat. *J Sex Med*. 4(2):348-363.

- Wingard CJ, Husain S, Williams J, James S. (2003) RhoA-Rho kinase mediates synergistic ET-1 and phenylephrine contraction of rat corpus cavernosum. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 285(5):R1145-1152.
- Xie D, Odronic SI, Wu F, Pippen AM, Donatucci CF, Annex BH. (2007) A mouse model of hypercholesterolemia-induced erectile dysfunction. *J Sex Med*. 4(4 Pt 1):898-907.
- Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Goto K, Masaki T. (1988) A novel peptide vasoconstrictor, endothelin, is produced by vascular endothelium and modulates smooth muscle Ca<sup>2+</sup> channels. *J Hypertens Suppl*. 6(4):S188-191.
- Yang AL, Chao JJ, Lee SD. (2007) Altered insulin-mediated and insulin-like growth factor-1-mediated vasorelaxation in aortas of obese Zucker rats. *Int J Obes (Lond)*. 31:72-77.
- Yang YJ, Hope ID, Ader M, Bergman RN. (1989) Insulin transport across capillaries is rate limiting for insulin action in dogs. *J Clin Invest*. 84(5):1620-1628.
- Yildirim S, Ayan S, Sarioglu Y, Gltekin Y, Btner C. (1999) The effects of long-term oral administration of L-arginine on the erectile response of rabbits with alloxan-induced diabetes. *BJU Int*. 83(6):679-685.
- Yokoyama I, Ohtake T, Momomura S, Yonekura K, Woo-Soo S, Nishikawa J, Sasaki Y, Omata M. (1998) Hyperglycemia rather than insulin resistance is related to reduced coronary flow reserve in NIDDM. *Diabetes*. 47(1):119-124.
- Yokoyama I, Yonekura K, Ohtake T, Yang W, Shin WS, Yamada N, Ohtomo K, Nagai R. (2000) Coronary microangiopathy in type 2 diabetic patients: relation to glycemic control, sex, and microvascular angina rather than to coronary artery disease. *J Nucl Med*. 41(6):978-985.
- Zeiher AM, Krause T, Schächinger V, Minners J, Moser E. (1995) Impaired endothelium-dependent vasodilation of coronary resistance vessels is associated with exercise-induced myocardial ischemia. *Circulation*. 91(9):2345-2352.
- Zeng G, Nystrom FH, Ravichandran LV, Cong LN, Kirby M, Mostowski H, Quon MJ. (2000) Roles for insulin receptor, PI3-kinase, and Akt in insulin-signaling pathways related to production of nitric oxide in human vascular endothelial cells. *Circulation*. 101(13):1539-1545.
- Zeng G, Quon MJ. (1996) Insulin-stimulated production of nitric oxide is inhibited by wortmannin. Direct measurement in vascular endothelial cells. *J Clin Invest*. 98(4):894-898.
- Zhao W, Christ GJ. (1995) Endothelin-1 as a putative modulator of erectile dysfunction. II. Calcium mobilization in cultured human corporal smooth muscle cells. *J Urol*. 154(4):1571-1579.
- Zou M, Martin C, Ullrich V. (1997) Tyrosine nitration as a mechanism of selective inactivation of prostacyclin synthase by peroxynitrite. *Biol Chem*. 378(7):707-713.





## VII. SUMARY AND CONCLUSIONS





Obesity along with other metabolic and cardiovascular abnormalities such as insulin resistance (IR), dyslipidemia, impaired glucose tolerance and hypertension, jointly referred to as metabolic syndrome or prediabetes, are major cardiovascular risk factors (Ford, 2005). Obesity and metabolic syndrome greatly enhance the prevalence of coronary heart disease and heart failure, even more than diabetes mellitus (Alexander et al., 2003). The increased risk of coronary artery disease in obese subjects is explained in part by higher rates of diabetes, hypertension and dyslipidemia, although obesity *per se* is a risk factor for coronary artery disease (Fontaine et al., 2003). Both obesity and type 2 diabetes are associated with moderate-to-severe IR and endothelial dysfunction, which are key factors in the pathogenesis of myocardial ischemia (Cersosimo et al., 2006).

Erectile dysfunction is currently considered as an early clinical manifestation of a more generalized vascular disease due to its high prevalence in patients with cardiovascular risk factors including diabetes, hypertension, hyperlipidemia, and tobacco abuse (Sullivan et al., 1999; Montorsi et al., 2003). Erectile dysfunction is a common complication and an important cause of decreased quality of life in men with diabetes, and its prevalence is three times higher in type 1 and type 2 diabetic patients than in the general population (Hakim and Goldstein, 1996; Vickers and Wright, 2004). Growing epidemiological evidence associates the subsequent risk of erectile dysfunction with the presence of risk factors for coronary artery disease such as obesity, hypertension, and dyslipidemia (Montorsi et al., 2003; Montorsi et al., 2006). On the other hand, the rate of erectile dysfunction in patients with coronary artery disease is as high as 42-57%, and the incidence of erectile dysfunction in diabetic patients with silent ischemia is 34.8% versus 4.7% in those without silent ischemia (Gazzaruso et al., 2004; Montorsi et al., 2003; Montorsi et al., 2006). This has recently led to the suggestion that erectile dysfunction could be a potential marker for silent coronary artery disease in type 2 diabetes mellitus patients (Gazzaruso et al., 2004; Montorsi et al., 2006).

IR is typically defined as a decreased sensitivity to the metabolic actions of insulin that promote glucose disposal. However, endothelial dysfunctions along with diminished sensitivity to the actions of insulin in the vascular endothelium contribute to the phenotype of IR states by impairing the ability of the hormone to modify blood flow and to promote substrate delivery (Baron et al., 1991; Kim et al., 2006; Kim et al., 2008). Insulin binding to its receptor on the endothelium activates the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt pathway that in turn phosphorylates endothelial nitric oxide (NO) synthase (eNOS) at Ser<sup>1177</sup> inducing NO release and vasodilatation (Zeng et al., 2000). This pathway also regulates GLUT 4 translocation and

glucose uptake and couples the metabolic and vascular actions of the hormone (Kim et al., 2006). Insulin can also activate the pro-atherogenic Ras-Raf-MAPK pathway which is associated with gene expression, mitogenesis, cell growth and the production of vasoconstrictor endothelin 1 (ET-1) in the vascular endothelial cells (Cardillo et al., 1999). A selective impairment of the insulin-activated Akt signaling pathway with an intact MAPK pathway have been shown to underlie the profound IR in type 2 diabetic and obese non-diabetic individuals (Cusi et al., 2000). Furthermore, vasodilatation in response to insulin is blunted in skeletal muscle arterioles from IR animals, due to altered NO release through the PI3K/eNOS pathway (Eringa et al., 2007). In arteries from type 2 diabetic patients, the Akt signaling pathway is also downregulated leading to a decreased NO availability and therefore compromising arterial function (Okon et al., 2005).

Several factors have been reported to be involved in the injury of the insulin pathways that contribute to the development of IR. Thus, constant exposure of the vasculature to abnormal higher levels of circulating free fatty acid (FFA) in IR states such as obesity and type 2 diabetes, may simultaneously cause IR in metabolic tissues and endothelial dysfunction in vascular tissues (Kim et al., 2006; Dresner et al., 1999; Steinberg et al., 2000). Earlier *in vivo* studies have shown that FFA elevation impairs both glucose up-take and basal and insulin-mediated NO production and vasodilatation in human skeletal muscle (Steinberg et al., 2000).

Endothelial dysfunction often refers to a situation of reduced bioavailability and consequently impaired vasodilator effect of endothelium-derived relaxing factors such as nitric oxide (NO), prostacyclin or endothelium-derived hyperpolarizing factor. However, one additional important alteration in endothelial dysfunction is an increased production and biological activity of the potent vasoconstrictor and pro-inflammatory peptide ET-1 which plays an important pathogenic role in vascular dysfunction and the development of cardiovascular disease (Böhm y Pernow, 2007).

In the present study, we comparatively investigated the effects of insulin resistance on coronary and penile arteries from an animal model of Metabolic Syndrome. The aims of the study were:

- a) To assess the vascular actions and the underlying endothelial signaling pathways of insulin in coronary and penile arteries from *Zucker* rats.

- b) To evaluate the mechanisms involved in the pathogenesis of vascular insulin resistance by determining whether endothelial insulin signaling pathways are impaired in coronary and penile arteries from a rat model of insulin resistance/Metabolic Syndrome, the obese Zucker rat (OZR).
- c) To examine whether the mechanisms and receptor subtypes involved in ET-1 vascular actions are impaired in penile arteries from insulin resistant OZR.
- d) To assess the contribution of  $\text{Ca}^{2+}$  mechanism to the vascular actions of insulin and ET-1 in penile arteries and to determine whether  $\text{Ca}^{2+}$  metabolism upon activation with these agonists is impaired in insulin resistant states.

OZR is a well established genetic model of IR and Metabolic Syndrome caused by a dysfunctional gen of the leptin receptor. These animals progressively develop obesity, type 2 diabetes and hypertension (Guerre-Millo 1997). Studies of vascular reactivity to insulin and ET-1 with/without simultaneous measurements of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  levels were performed by using branches of the left descending coronary arteries and dorsal penile arteries from 17-18 weeks old male LZR and OZR, mounted in microvascular myographs for isometric tension recording. Western blot analysis was used to determine the total protein expression and activity of Akt, eNOS and MAPK. Immunohistochemistry was applied on stained arterial cross sections to determine the presence and distribution of ET receptors across the arterial wall in penile arteries.

**The main findings of this study were:**

1. The relaxant endothelium-dependent response to insulin was larger in distal intramyocardial coronary arteries and it is preserved in arteries from OZR compared to healthy controls. In contrast, insulin-induced relaxation is impaired in penile arteries from the same model of insulin resistance.
2. Insulin-induced relaxation involved activation of the PI3K/Akt pathway and an enhancement of Akt expression in healthy coronary arteries. This pathway was preserved in OZR, and the basal activity of Akt was up-regulated in OZR. However, diminished relaxation to insulin in penile arteries from OZR was due in part to a decreased PI3K activation.
3. Up-regulation of the PI3K/Akt pathway preserved  $\beta$ -adrenergic relaxation in coronary arteries from OZR, while impairment of this pathway induced a significant reduction of the  $\beta$ -adrenergic relaxation in penile arteries from the same animals.

4. Insulin-induced relaxation involved NO release in coronary arteries from both LZR and OZR, basal activity of eNOS being up-regulated in obese animals. In contrast, insulin-induced NO release is impaired in penile arteries from the same animals.
5. Neither MAPK activation nor contractile ET-1 receptor activation seem to have a role in the vasoactive effects of insulin in coronary arteries, although both basal and insulin-stimulated MAPK activity were significantly decreased in coronary arteries from obese animals, which probably affects the proliferative actions associated with this signaling pathway activated by insulin.
6. Neither MAPK activation, nor contractile ET-1 receptor activation seem to be involved in the vasoactive effects of insulin in penile arteries from healthy animals. However, in arteries from obese rats, increased MAPK activity induced the release of a vasoconstrictor compound whose effects are compensated by the production of relaxant prostanoids.
7. Supraphysiological concentrations of free fatty acids did not affect either the endothelium-dependent relaxations or the insulin-induced eNOS or Akt phosphorylation but reduced both basal and insulin-stimulated MAPK activity in coronary arteries from healthy animals, which could explain the impairment of this pathway in obese animals.
8. ET-1 induced a vasoconstriction of similar magnitude in penile arteries from LZR and OZR, despite it evoked a larger increase in  $[Ca^{2+}]_i$  in obese animals, unlike other vasoconstrictor agonists such as  $TxA_2$  that increased contraction in association with a parallel increase in  $[Ca^{2+}]_i$ . The enhancement of  $[Ca^{2+}]_i$  not associated to contraction evoked by ET-1 is likely related to vascular remodeling processes in the arterial wall.
9. The vasoconstrictor effect of ET-1 is mainly mediated by  $ET_A$  receptors located on smooth muscle in penile arteries from control animals, while in arteries from obese animals, there is also involvement of contractile  $ET_B$  receptors located on smooth muscle and coupled to the increase in  $[Ca^{2+}]_i$ .

#### **Final conclusion:**

In summary, insulin resistance differentially affects penile and coronary arterial beds. Thus, while in penile arteries there is an impairment of the PI3K/Akt/eNOS pathway and decreased NO production, the endothelium-dependent relaxations mediated by this pathway are preserved in coronary arteries due in part to an up-regulation of PI3K/Akt/eNOS activity

and to a reduced vasoconstrictor activity of the MAPK pathway. Endothelial dysfunction in penile arteries probably underlies the erectile dysfunction associated with insulin resistance states such as diabetes and obesity. Moreover, development of vascular insulin resistance and the associated endothelial dysfunction in penile arteries prior to its set-up in coronary arteries supports clinical evidence that erectile dysfunction is a sentinel of subclinical coronary artery disease.